

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe
Arbeitsgruppe Molekulare Neurowissenschaften

in Zusammenarbeit mit dem

Department of Microbiology & Immunology
der Thomas Jefferson Universität Philadelphia
Direktor: T. L. Manser, PhD
M. J. Schnell, PhD & B. Dietzschold, DVM

Rabies-Virus-Infektion der Maus: Einfluss des viralen Glykoproteins auf die Immunantwort im ZNS.



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tilman Krieger aus Kassel

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 16.12.2010
gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. M. Bette

Koreferent: PD Dr. G. Höglinger

**Gewidmet meinen Eltern
in Dankbarkeit**

Staunen ist der erste Schritt zu einer Erkenntnis.
Louis Pasteur

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Englische Zusammenfassung	2
2 Einleitung	3
2.1 Das Rabies-Virus (RV)	4
2.1.1 Taxonomie	4
2.1.2 Aufbau des Rabies-Virus	4
2.1.3 Übertragungswege	7
2.1.4 Krankheitsverlauf	8
2.1.5 Diagnose	9
2.1.6 Therapie	11
2.2 Immunreaktionen bei Rabies-Virus-Infektion	12
2.2.1 Untersuchung zentraler Immunreaktionen mittels einer ex- perimentell induzierten RV-Infektion	12
2.2.2 Rabies-Virus-Antikörper	14
2.2.3 Mikroglia	15
2.2.4 Astroglia	15
2.2.5 T-Lymphozyten	16
2.2.6 Zytokine	17
3 Material	22
3.1 Mäuse, Zellen & Viren	22
3.1.1 Mäuse	22
3.1.2 Viren	22
3.1.3 Zellen.	22
3.2 Oligonukleotide	23
3.3 Chemikalien	24
3.3.1 Perfusionslösungen	25
3.4 Medikamente	26
3.5 Geräte	26
3.6 Software	28
3.7 Reaktions-Kits	28

3.8	Antikörper	31
3.8.1	Primärantikörper	31
3.8.2	Sekundärantikörper	32
3.9	Sonstige Reagenzien, Medien etc.	32
4	Methoden	35
4.1	Lagerung von Proben	35
4.2	Infektion der Mäuse	35
4.3	Festlegung des Abbruchkriteriums	35
4.4	Bestimmung des VNA-Titers	38
4.4.1	Blutentnahme	38
4.4.2	Herstellung einer Zellsuspension.	39
4.4.3	Vorbereitung der Viren.	40
4.4.4	Infektion der Zellen.	40
4.4.5	Färbung.	41
4.4.6	Auswertung.	41
4.5	Gewebefixierung mittels Perfusion	42
4.5.1	Narkose der Tiere	42
4.5.2	Technische Vorbereitung	42
4.5.3	Präparation und Perfusion	44
4.5.4	Organpräparation	46
4.5.5	Einbetten der Gewebe	47
4.6	Histologische Färbungen	48
4.6.1	Vorbereitung der Objektträger	48
4.6.2	Giemsa-Färbung	49
4.6.3	Immunhistochemie (IHC, Einfachmarkierung DAB / Nickel)	51
4.6.4	IHC-Doppelmarkierung (DAB / Fluoreszenz)	53
4.6.5	Immunhistochemische Doppelfluoreszenzmarkierung	58
4.6.6	TUNEL-Färbung	59
4.7	MCID	61
4.8	qRT-PCR	62
4.8.1	Gewinnung von Gewebeproben	63
4.8.2	Homogenisierung der Proben	64
4.8.3	RNA-Extraktion	64
4.8.4	Bestimmung der RNA-Konzentration	65
4.8.5	Reverse Transkription genomischer RNA	66
4.8.6	Reverse Transkription nicht-genomischer RNA	67

4.8.7	Durchführung der quantitativen real-time PCR	68
4.8.8	Auswertung der quantitativen real-time PCR	69
4.9	Signifikanzprüfung	70
4.9.1	VNA-Titer	70
4.9.2	Quantitative Realtime-PCR	71
4.9.3	Weitere Signifikanzprüfungen	71
5	Ergebnisse	72
5.1	Auswirkung unterschiedlicher Infektionsrouten auf die Klinik der Infektion	72
5.2	Virus-Quantifizierung	75
5.2.1	PCR-Analyse	75
5.2.2	Immunhistochemische Analyse	76
5.3	Analyse der Immunantwort	80
5.3.1	Glia-Aktivierung	83
5.3.2	T-Zell Infiltration	87
5.3.3	Apoptose-Nachweis	87
5.3.4	Autophagie	88
6	Diskussion	90
7	Nachtrag: Überlegungen zur Therapie-Optimierung	96
8	Literatur	100
9	Anhang	127
9.1	Lebenslauf	127
9.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	129
9.3	Danksagung	130
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	131

Abkürzungen

-/-	knock out
AALAS	American Association for Laboratory Animal Science
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
B/H	Bouin-Hollande
Bez.	Bezeichnung
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSL	Biosafety level
bzw.	beziehungsweise
CA	Ammonshorn (Cornu ammonis)
cfu	Kolonien bildende Einheit (colony forming unit)
Ct	Threshold Cycle
Ctx	Cortex
d.h.	das heißt
dpi	dies post infectionem
EAE	eximentell induzierte Autoimmun-Enzephalomyelitis
EF	Expressionsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
f.c.	mean fold change
FAT	Fluorescent Antibody Test
FBS	Fetal-bovines Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GD	Gyrus dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GOI	gene of interest
HCV	Hepatitis-C-Virus
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	housekeeping gene
HRIG	Humanes Rabies Immunglobulin

i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneale (-r/-s)
ICN	Initial Copy Numbers
ICN	initial copy numbers
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IU	Internationale Einheiten (International Units)
k.o.	knock out
kb	Kilo-Basenpaare
l	Liter
LC3	Light Chain 3
log	Logarithmus (Basis 10)
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	molar
min	Minuten
MP	Milwaukee Protokoll
MRT	Magnetresonanztomographie
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NTC	Non Template Control
o.g.	oben genannte (-r/-s)
OLS	ordinary least squares
p.i.	post infectionem
PEP	Postexpositionsprophylaxe
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	Quantitative real-time RT-PCR
RIG	Rabies Immunglobulin
RKI	Robert Koch-Institut
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
RV	Rabies-Virus
RV-G	Rabies-Virus Glykoprotein
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
s.	siehe
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)

sog.	sogenannte (-r/-s)
Std.	Stunde(n)
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
Tc	zytotoxische T-Lymphozyten
TESAP.....	3-(Triethoxysilyl)-propylamin
Th	T-Helfer-Lymphozyten
Thl.....	Thalamus
TLR	Toll-Like-Receptor
Treg.....	regulatorischen T-Lymphozyten
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEEV.....	Venezuelan Equine Encephalitis Virus
Verd.....	Verdünnung
vgl.	vergleiche
VNA	Virus-neutralisierende Antikörper
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Das Glykoprotein des Rabies-Virus (RV-G) spielt durch die Beeinflussung der Neuroinvasivität und durch die Modulation antiviraler Immunreaktionen eine zentrale Rolle bei der Rabies-Virus-Erkrankung (Tollwut). Bisher ist noch nicht bekannt, durch welchen Mechanismus RV-G die Pathogenität des Virus beeinflusst, wenn dieses das ZNS erreicht hat. Um die Bedeutung der RV-G-Expression im ZNS zu untersuchen, infizierten wir Mäuse intranasal mit attenuierten Rabies-Viren des Stammes SPBN sowie mit Viren des Stammes SPBN-DOG4; dieser Stamm unterscheidet sich von SPBN insofern, als dass die für RV-G kodierende Gensequenz gegen die des hoch pathogenen Wildtyp-Stammes DOG4 ersetzt worden ist. Bei intramuskulärer Inokulation von SPBN überlebten alle der infizierten Mäuse, bei SPBN-DOG4 führte dies zu einer Mortalitätsrate von 30%. Bei intranasaler Inokulation hingegen führte die Infektion zu einer jeweiligen Mortalitätsrate von 100%. Die mittlere Überlebenszeit war dabei in der SPBN-Gruppe signifikant gegenüber der SPBN-DOG4-Gruppe erniedrigt, was aufgrund der beschleunigten Krankheitsprogression auf eine erhöhte Pathogenität von SPBN hinweist. Bei den mit SPBN infizierten Tieren fand sich zudem ein erniedrigter Spiegel von IL-6, von Virusneutralisierenden Antikörpern sowie eine verminderte Glia-Aktivierung. Diese verminderten immunologischen Abwehrreaktionen korrelierten mit einem verminderten Virus-Titer und einer verminderten globalen RV-G- und Ribonukleoprotein-Expression im gesamten ZNS. Bei der Quantifizierung der Virusmenge in einzelnen Neuronen konnte jedoch festgestellt werden, dass die zelluläre RV-G-Expression in der SPBN-Gruppe signifikant erhöht war. Dieser neue Befund zeigt klar, dass die zellulären Expressionspiegel und weniger die globale Viruslast im Gehirn wesentlich zu der Pathogenität des Rabies-Virus beitragen. Aufgrund dieser Daten könnte die Entwicklung von Behandlungsschemata, die zu einer Blockade der Expression von RV-G in einzelnen Neuronen führen, ein neues therapeutisches Konzept bei der Behandlung der Rabies-Virus-Erkrankung darstellen.

1.2 Englische Zusammenfassung

The rabies virus glycoprotein (RV-G) plays a central role in the pathogenesis of rabies by determining the neuroinvasiveness and by modulating antiviral immune responses. The mechanism by which RV-G determines the pathogenicity once the virus has reached the brain is still unknown. To study the role of RV-G in the CNS, we infected mice intranasally with the attenuated rabies virus variant SPBN or with the recombinant RV variant SPBN-DOG4. In SPBN-DOG4, the RV-G gene sequence of SPBN was replaced by that of the highly pathogenic street virus strain DOG4. Intramuscular inoculation resulted in 30% mortality in SPBN-DOG4-infected but not in SPBN-infected mice whereas intranasal inoculation of both RV variants resulted in 100% mortality. The mean time of survival was significantly lower in SPBN-infected mice as compared to those infected with SPBN-DOG4. These findings indicate a higher pathogenicity of the SPBN virus strain. Significantly lower virus neutralizing antibody serum titers and IL-6 mRNA levels in the brain and reduced glial activation paralleled the reduced mean time of survival of SPBN-infected animals. Additionally, a correlation with lower virus titers, reduced levels of RV-G and ribonucleoprotein expression in whole brain homogenates could be found. However, on the level of single infected neurons the amount of RV-G was higher in SPBN-infected mice. These data suggest that higher RV-G expression levels in individual infected neurons rather than the overall number of infected neurons defines the pathogenicity of a rabies virus strain. By limiting the cellular RV-G-expression in the brain, new therapeutical concepts in treatment of rabies virus infection could be developed.

2 Einleitung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde teils am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg, teils am Department of Microbiology and Immunology der Thomas-Jefferson-University Philadelphia, PA, USA, durchgeführt. In Philadelphia wurde mir ermöglicht, das für die Arbeit mit infektiösen Viren und infizierten Tieren notwendige Sicherheitslabor der Stufe BSL 3 zu benutzen.

Alle Tierexperimente wurden unter einheitlicher Tierpflege und unter Verwendung von Protokollen der American Association for Animal Science (AALAS) durchgeführt. Animal Welfare Assurance Number: A3085-01.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden zur Publikation eingereicht. Sofern nicht anders bezeichnet, handelt es sich bei allen Grafiken um eigene fotografische Aufnahmen, Darstellungen bzw. Zeichnungen.

Die folgenden Ausführungen bedürfen grundlegenden Definitionen:

- Rabies-Virus Wildtyp-Stamm (Rabies virus street virus strain): Ein Virus-Stamm, der aus Tieren isoliert wurde, welche auf natürliche Weise infiziert wurden (beispielsweise Hunde oder Füchse).
- Pathogener Rabies-Virus-Stamm: Ein Virus-Stamm, der nach peripherer Inokulation eine Rabies-Virus-Infektion (Tollwuterkrankung) auslöst.
- Attenuierter Rabies-Virus-Stamm: Ein Virus-Stamm mit stark reduzierter Fähigkeit, nach peripherer Inokulation eine Tollwuterkrankung im infizierten Tier auszulösen [158].

2.1 Das Rabies-Virus (RV)

2.1.1 Taxonomie

Das Rabies-Virus (RV) ist ein streng neurotropes Virus aus der Familie der Rhabdoviridae. Diese umfasst die zwei Gattungen der Vesiculoviridae sowie die der Lyssaviridae [140]. Als ein bedeutsamer Vertreter der Vesiculoviridae ist das Vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) zu nennen. Bei dem Rabies-Virus handelt es sich um ein Einzel(-)-Strang-RNA-Virus (ss(-)RNA) aus der Gattung der Lyssaviridae [87] (s. Abb. 1). Die Rabies-Viren werden wiederum in zwei Phylogruppen mit insgesamt 11 Genotypen eingeteilt [61, 124]. Genotyp 1 ist für die meisten Infektionen und Todesfälle bei Menschen und Tieren verantwortlich [124].

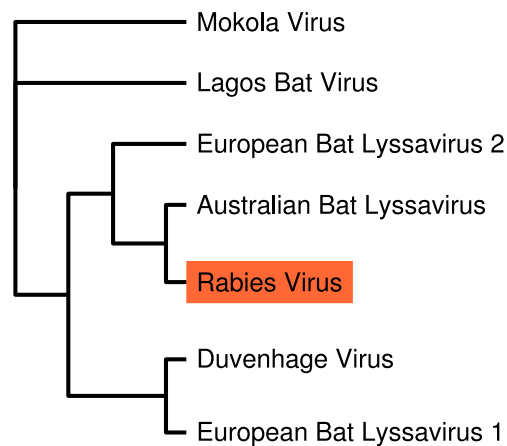


Abbildung 1: Die Gattung der Lyssaviridae mit ihren 7 Genotypen. Leicht modifizierte Abbildung aus [87].

2.1.2 Aufbau des Rabies-Virus

Die Hülle des Rabies-Virus wird durch die Membran und das innen anliegende M-Protein gebildet. Im Inneren befindet sich die virale RNA, die durch N-Protein in einer helikalen Struktur gehalten wird (s. Abb. 2).

Rabies-Viren haben ein kleines Negativ-Strang RNA-Genom der Größe von ca. 12kb. Dieses kodiert die fünf Proteine Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Glykoprotein (G bzw. im Folgenden auch mit RV-G bezeichnet) und das Large-(L)-Protein [27, 87, 171] (für eine schematische Darstellung s. Abb. 2).

Das P-Protein ist ein Cofaktor der L-Polymerase und wird für die RNA-Einkapselung benötigt [30, 71]. Ein Komplex aus einem L-Protein und drei P-Proteinen fungiert bei der Virusreplikation als RNA-abhängige RNA-Polymerase, welche die genomische (-)-RNA in mRNA transkribiert. P- und L-Protein sind gemeinsam mit dem helikalen Ribonukleoprotein-(RNP)-Komplex assoziiert, welches sich bei allen Mitgliedern der Familie der Rhabdoviridae wiederfindet [62]. Bei der Abkapselung der Viren werden diese RNP-Komplexe von einer membranösen Hülle umschlossen, deren Innenseite mit M-Proteinen ausgekleidet ist [113]. Die Ausbildung von RNP-M-Komplexen ist für ein effektives Abkapseln (Budding) von Virus-Partikeln essenziell [112, 113]. Des weiteren sind in der Virus-Hülle trimere Transmembran-Proteine verankert, die mit dem RV Glykoprotein (RV-G) assoziiert sind. Dieses nach außen hin präsentierte RV-G fungiert durch die Interaktion mit Zellrezeptoren und die Förderung der Virus- und Zellmembranfusion als ein wesentlicher Faktor für die Virus-Aufnahme in Neurone [39, 50, 103]. Zudem bestimmt der Phänotyp des RV-G maßgeblich die Neuroinvasivität des RV, also dessen Fähigkeit, von einer peripheren Inokulationsstelle (z.B. dem Skelettmuskel) in das Zentrale Nervensystem (ZNS) zu migrieren [12, 40, 50, 108, 120, 163]. Schon geringfügige Veränderungen der Aminosäuresequenz des RV-G können zu ausgeprägten Veränderungen der Pathogenität des RV führen; so kann aus einem pathogenen ein nicht-pathogener Phänotyp entstehen und umgekehrt. Es führt z.B. eine Mutation an Position 333 des Virus-Genoms (Mutation von Arginin zu Glutamat) zu einer Veränderung der antigenetischen Stelle 3 des RV-G. In der Folge verlieren die mutierten Viren ihre Fähigkeit, bei peripherer Infektion eine tödlich verlaufende RV-Erkrankung in adulten immunkompetenten Mäusen hervorzurufen. Wahrscheinlich ist die Ausbreitung der Viren von der peripheren Inokulationsstelle ins ZNS beeinträchtigt, so dass eine Infektion des ZNS ausbleibt [40, 108, 111]. Variationen an anderen Stellen der Aminosäuresequenz der antigenetischen Stelle 3 des Glykoproteins im Bereich der Positionen 164 bis 303 scheinen ebenfalls großen Einfluss auf die Pathogenität auszuüben [77].

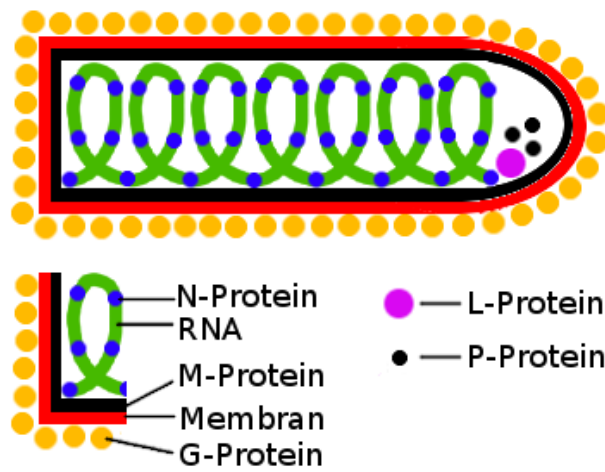


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Rabies-Virus. Orientiert an einer Abbildung in [22].

Für die am Department of Microbiology and Immunology in Philadelphia durchgeführten Versuche verwendeten wir die Virus-Stämme SPBN sowie SPBN-DOG4. Genetisch unterscheiden sich diese Stämme in der Sequenz des Glykoproteins (s. Abb. 3). SPBN-DOG4 verfügt über die Glykoprotein-Gensequenz des hochpathogenen Wildtyp-RV-Stammes DOG4.



Abbildung 3: Schematische Darstellung des Genoms des Rabies-Virus. Orientiert an einer Abbildung in [87], S. 1224.

2.1.3 Übertragungswege

RNA-Viren, zu denen auch das RV als Erreger der Tollwut zählt, stellen das weltweit am stärksten verbreitete ZNS-Infektionen induzierende Pathogen dar; dazu zählen neben dem Rabies Virus das West-Nil-Virus, das Polio-Virus und das Japanische Enzephalitis-Virus [109].

Die Verbreitung der Tollwut konnte durch groß angelegte Impfkampagnen für Haus- und Wildtiere sowie die Vakzinierung von Menschen mit erhöhtem Infektionsrisiko (Veterinärmediziner, Forstarbeiter etc.) in der westlichen Welt weitgehend eingedämmt werden. Dennoch versterben immer noch schätzungsweise 55 000 Menschen jährlich infolge der Erkrankung [188]. Am dramatischsten ist die Situation in Entwicklungs- und Schwellenländern. Allein Indien zählt jährlich 30 000 menschliche Todesopfer. Dort gibt es zudem für Erkrankung und Tod durch RV-Infektion keine Meldepflicht, weshalb die Dunkelziffer auf ein Vielfaches der offiziellen Zahlen geschätzt wird [19].

Meist wird das RV durch den Biss eines infizierten Tieres auf den Menschen übertragen. Die im Speichel befindlichen Viren dringen in Nervenendigungen im Bereich der Bisswunde ein. Mittels retrogradem axonalem Transport gelangen die Viren ins ZNS, wo sie sich replizieren. Es wird angenommen, dass sie von dort orthograd in die Speicheldrüsen weiter transportiert werden und somit wieder im Speichel des infizierten Tieres bzw. Menschen nachgewiesen und weiter übertragen werden können [36]. Generell ist der Speichel RV-infizierter Tiere und Menschen infektiös, auch durch Schleimhautkontakt mit diesem ist eine Übertragung der Infektion möglich [189].

In einigen Asiatischen Ländern wie Vietnam, Südkorea, Thailand oder Indien ist es üblich, Hundefleisch zu essen [13]. Zwischen 2005 und 2007 häuften sich humane Tollwuterkrankungen in den Chinesischen Provinzen Guizhou, Guangxi und Hunan. Durch Gensequenzierungen konnte gezeigt werden, dass dieselben RV-Stämme bei Hunden vorkamen, die zum Verzehr in Restaurants bestimmt waren. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass auch der Verzehr infizierter Tiere einen Übertragungsweg der Tollwuterkrankung darstellt [167].

In den letzten Jahren wurde zudem mehrfach berichtet, dass Patienten Symptome der Tollwut entwickelten und verstarben, nachdem ihnen Organe transplantiert worden waren [91,191]. Dies konnte geschehen, weil die Symptome der Spender vor ihrem Tod missinterpretiert wurden und Spenderorgane nicht routinemäßig auf Rabies getestet werden – dies liegt zum einen in der Seltenheit des Auftretens der Erkrankung in Westeuropa begründet. Zum anderen ist die bisher verfügbare Diagnostik zu langwierig, um den engen Zeitraum zwischen Organentnahme und Transplantation einzuhalten [191].

Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang die relativ seltene kryptische Tollwuterkrankung (cryptic rabies). Der Name leitet sich daher, dass bei Menschen eine Rabies-Virus-Infektion nachgewiesen wurde, ohne dass ein in damit in Zusammenhang stehendes Bissereignis eruierbar war [180]. Allerdings kann die bereits erwähnte mitunter sehr lange Inkubationszeit ein solches verschleiern – post-mortale Analysen des Virus-Genoms ließen darauf schießen, dass es sich um bei Fledermäusen verbreitete Stämme handelte [115]. Es ist daher anzunehmen, dass entweder ein Fledermausbiss nicht bemerkt wurde oder eine aerosolische Übertragung von Exkrement-Partikeln stattfand [57]. Generell gewinnen Fledermäuse, hauptsächlich in den USA, als Vektoren an Bedeutung – dort sind dies v.a. die Silberhaar-Fledermäuse (*Lasionycteris noctivagans*) sowie eine Unterart der Zwegfledermäuse, *Pipistrellus subflavus* [115]. Die Kryptische Tollwuterkrankung ist aufgrund der ausbleibenden Postexpositionsprophylaxe die am häufigsten tödlich verlaufende Tollwuterkrankung in den USA [115].

2.1.4 Krankheitsverlauf

Die Inkubationszeit einer RV-Infektion beträgt durchschnittlich zwischen ein und zwei Monaten. Sie ist jedoch sehr variabel und umfasst eine Spannweite von weniger als einer Woche bis zu mehr als sechs Jahren [64]. Die Erkrankung verläuft beim Menschen in drei Stadien: Im *Prodromalstadium* bestehen uncharakteristische Beschwerden wie Kopfschmerzen, Appetitlosigkeit und Fieber sowie Schmerzen an

der Bissstelle. Es folgt die *akute neurologische Phase*, die nachfolgend genauer beschrieben wird. Das Endstadium stellt das *Koma* dar; der Tod tritt unter den Zeichen einer Atemlähmung ein [152]. Nach dem Einsetzen erster Symptome überleben die Infizierten nur selten länger als 7 Tage [179].

Die akute neurologische Phase der RV-Erkrankung kann bei Menschen drei verschiedene Formen annehmen: Die klassische enzephalitische (bzw. furiose) Form, die paralytische (bzw. stumme) Form sowie die nicht-klassische (bzw. atypische) Form [64]. Alle diese Verlaufsformen enden mit dem Tode [64].

Bei der am häufigsten zu beobachtenden klassischen Form überwiegen Angst und Erregungszustände. Spasmen der Atemmuskulatur, des Larynx und des Pharynx führen zu einer Unfähigkeit, Flüssigkeiten zu schlucken. Durch Konditionierung kann bereits der Anblick von Wasser diese Spasmen auslösen, was in der Literatur oft als Hydrophobie beschrieben wird. Weitere Zeichen sind Hypersalivation (mit Schaumbildung), Tachykardie und Hyperreflexie. Ebenso werden regelmäßig Episoden von Wahnvorstellungen und Halluzinationen beschrieben. Im Endstadium kommt es zu Paralysen und zum Koma. Differentialdiagnosen sind hysterische Pseudohydrophobie, Tetanus, andere Enzephalitiden, Delirium tremens und verschiedenen Intoxikationen [179].

Die paralytische Form zeichnet sich durch schlaffe aufsteigende Paralysen und sensorische Ausfälle aus. Der Tod durch respiratorische Insuffizienz und Bulbärparalyse tritt später ein als bei der klassischen Form. Differentialdiagnosen dieser Erkrankungsform sind postvakzinale Enzephalomyelitis, Polyomyelitis [179] und andere aufsteigende Paralysen wie das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) [181].

Die atypische Form der RV-Erkrankung wird in der Mehrzahl der Fälle durch Fledermausbisse übertragen. Bei diesem Krankheitsverlauf kommt es zu motorischen und / oder sensiblen Ausfällen, gyriformen Bewegungsstörungen und zu Myoklonien. Zu den neuropathischen Schmerzen, die auch bei den anderen beiden Verlaufsformen auftreten, kommen radikuläre Schmerzen während des Prodromalstadiums. Zudem kann es zum Auftreten von phobischen Spasmen der Larynx- und Pharynxmuskulatur sowie zu Halluzinationen kommen [64].

2.1.5 Diagnose

Der erste diagnostische Schritt bei Verdacht auf eine RV-Exposition ist die Anamneseerhebung [152]. Im Falle der Kryptischen Form der Tollwuterkrankung ist ein Expositionseignis in der Regel jedoch nicht eruierbar. Danach müssen die bereits aufgeführten Differentialdiagnosen abgeklärt werden.

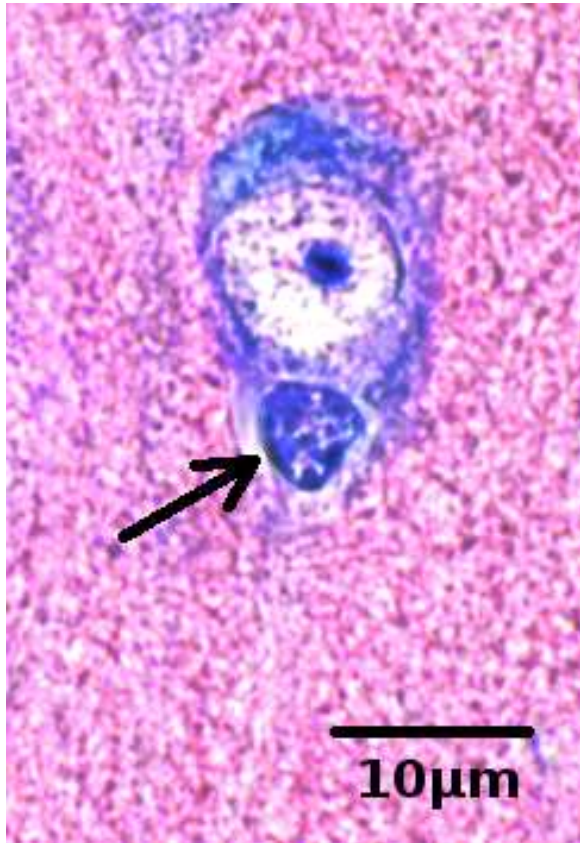


Abbildung 4: Ein Negrikörperchen (Pfeil) im Zytoplasma eines Neurons. Typische Histomorphologische Veränderung bei RV-Infektion. Maus, infiziert mit SPBN.

Der Fluoreszenz-Antikörpertest [17] gilt als Goldstandard zur Diagnostik *intra vitam* [188]. Es lässt sich auch Rabies-Virus-spezifische RNA in Körperflüssigkeiten wie Speichel und Liquor cerebrospinalis nachweisen [64], weitere mögliche Gewebeproben sind Nackenhautbiopsien und Epithelzellen der Cornea [152]. Allerdings führen alle *intra vitam* eingesetzten Verfahren oft zu falsch-negativen Resultaten und stellen folglich keine Ausschlusskriterien dar [152].

Der Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) könnte zur Abgrenzung von möglichen Differentialdiagnosen, insbesondere anderer entzündlicher Hirnerkrankungen, hilfreich sein [146].

Die Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose gelingt sicher erst *post mortem* durch Untersuchung von Hirngewebe [152]. Das Vorhandensein von Negrikörperchen (intrazelluläre Okklusionen, s. Abb. 4) ist ein pathognomonisches Merkmal der RV-Infektion [4, 84]. Allerdings ist diese histomorphologische Veränderung oft nicht sicher auszumachen [25]. Sicherer ist dagegen die Durchführung eines Immunfluoreszenztestes (Fluorescent Antibody Test, FAT) [25, 152]. Dabei werden spezifische Antigene mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

2.1.6 Therapie

Einen wirksamen Schutz gegen die Infektion mit dem RV und der Ausbildung des Krankheitsbildes der Tollwut bietet bisher nur die Impfung mit inaktivierten Rabies-Viren. Wenn eine Infektion wahrscheinlich ist, z.B. nach einem Tierbiss, so wird eine Postexpositionsprophylaxe durchgeführt, die in der Regel hocheffektiv ist. Dazu wird die Eintrittsstelle gründlich gereinigt, die betroffene Person mit einer Zellkultur-Vakzine aktiv immunisiert sowie Humanes Rabies Immunglobulin (HRIG) als passive Immunisierung verabreicht [82]. Eine detaillierte Ausführung findet sich in Abschnitt 7.

Eine effektive Therapie, die bei bereits bestehenden klinischen Zeichen der zentralnervösen Schädigung angewendet werden könnte, existiert bisher noch nicht [80]. Wenn das RV das ZNS bereits erreicht hat und sich die Erkrankung klinisch manifestiert, folgt die Therapie meist einem palliativen Ansatz, um dem Patienten sowie dessen Angehörige nicht unnötig zu belasten. Von der Gabe von Rabies Immunglobulin (RIG) wird in diesem Krankheitsstadium abgeraten, da dies zum einen ineffektiv ist und zum anderen im Tiermodell zu einer Progression des Krankheitsverlaufs führte. In der Literatur ist dieser Effekt als „early death phenomenon“ beschrieben [185].

Ein neues Therapieschema steht seit dem ersten dokumentierten Fall der Genesung einer Patientin mit manifester RV-Infektion zur Verfügung. Sie erhielt weder eine Pre- noch eine Postexpositionsprophylaxe [23]. Gemäß der Erstanwendung ging dieses Therapieschema als „Milwaukee Protokoll“ (MP) in die Literatur ein [185].

Im Oktober 2004 wurde bei einem zuvor gesunden 15-jährigen Mädchen in Fond du Lac County, Wisconsin, USA, die Diagnose der RV-Infektion gestellt. Sie hatte bereits klinische Zeichen der Tollwut-Erkrankung; ferner berichtete sie, dass sie einen Monat zuvor von einer Fledermaus gebissen worden war. Aufgrund der progredienten Symptomatik wurden neuroprotektive Maßnahmen eingeleitet, u.a. die Induktion eines Komas mittels Ketamin und Midazolam. Zudem wurde das Virostatikum Ribavirin (ein Nukleosid-Analogon) verabreicht. Das Koma wurde über 7 Tage aufrecht erhalten. Während dieser Zeit konnte ein Anstieg körpereigener Rabies-spezifischer Antikörper im Liquor gemessen werden. Als Langzeitschäden blieben lediglich eine Ataxie sowie eine Dysarthrie bestehen [183].

Weiterhin bleibt ungeklärt, was der entscheidende Faktor war, der zur Bildung von VNA und dem Überleben der Infektion führte. Auch, ob ein durch Ketamin und Midazolam induziertes Koma im Sinne der Neuroprotektion sinnvoll ist, wurde

bisher nicht geklärt [79]. Möglicherweise können dadurch zerebraler Gefäßspasmen verhindert werden [184]. Versuche, das Virus aus Speichelproben zu isolieren, waren erfolglos; es ist daher prinzipiell möglich, dass eine Infektion mit attenuierten Viren vorlag [183].

Das MP wurde seit der Erstbeschreibung mehrfach an RV-infizierten Menschen angewendet, insgesamt jedoch nur mit mäßigem Erfolg. Eine dem MP entsprechende Behandlung wurde bei einem RV-infizierten 33-jährigen Mann am Chulalongkorn Universitätsklinikum Bangkok, Thailand, begonnen. Dieser Patient entwickelte jedoch keine RV-spezifischen Antikörper und verstarb am achten Tag p.i. in der Klinik [65]. Im Jahre 2008 wurde in Floresta Pernambuco, Brasilien, wiederum der Fall eines 15-jährigen Jungen dokumentiert, der eine manifeste Rabies-Virus-Infektion durch Anwendung des MP überlebte [141]. Insgesamt liegt die Überlebensrate durch Anwendung des MP bei manifester Infektion nach einer ersten Auswertung von 24 Anwendungen bei etwa 9% [185].

Die weitere Aufklärung des Wirkungsmechanismus dieses bisher einzigen kurativen Therapieansatzes und der erkrankungsspezifischen Pathomechanismen könnte dazu führen, dass in Zukunft wirkungsvollere Therapieoptionen zur Behandlung der klinisch manifesten RV-Infektion zur Verfügung stehen.

2.2 Immunreaktionen bei Rabies-Virus-Infektion

Das RV-G ist zum einen für das Ausbreitungsverhalten der Viren im ZNS von entscheidender Bedeutung, zum anderen spielt es eine zentrale Rolle für die Detektion und Eliminierung des RV durch das Immunsystem des Wirts. Das RV-G als Oberflächenantigen von Virus-Partikeln ist der wesentliche Faktor, der die Produktion Virus-neutralisierender Antikörper (VNA) induziert. Diese stellen den wesentlichen Abwehrmechanismus des Wirts gegen eine RV-Infektion dar [29, 38, 54]. Zusätzliche Immunreaktionen des Wirts wie antivirale Zytokine [70], das ZNS infiltrierende T-Zellen sowie eine lokale Immunantwort durch Astroglia- und Mikrogliazellen [47] können ebenfalls zu einer effektiven antiviralen Immunantwort führen.

2.2.1 Untersuchung zentraler Immunreaktionen mittels einer experimentell induzierten RV-Infektion

Das Rabies-Virus (RV) ist ein streng neurotropes Virus, das hauptsächlich Neurone befällt [70, 135]. Allerdings konnten *in vitro* auch Mikro- und Astrogliazellen mit RV infiziert werden [148]. Die am besten untersuchten Viren, die primär Neu-

rone befallen, sind neben dem RV von Moskitos übertragene Alphaviren, wie das Sindbis-Virus, das Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV) und das Semliki-Forest-Virus. Alle diese Viren können bei Mäusen eine akute Enzephalomyelitis hervorrufen [59]. Im Gegensatz zum RV führt eine Infektion mit dem ebenfalls streng neurotrophen Borna-Virus (Borna Disease Virus, BDV) zu einer massiven Aktivierung des Immunsystems, einhergehend mit einer starken Leukozyten-Infiltration ins ZNS [56].

Infolge der RV-Infektion kommt es nicht zwangsläufig wie etwa bei einer Meningokokkenmeningitis zur Zelldestruktion bzw. Apoptose [190]. Morimoto et al. konnten zeigen, dass die Pathogenität verschiedener RV-Stämme invers mit der Apoptoserate von Neuronen korreliert [120]. Wie kaum ein anderer Erreger besitzt das RV eine immunmodulatorische Komponente: Proinflammatorische Prozesse werden möglicherweise gezielt herunterreguliert bzw. gehemmt. Eine Schlüsselrolle spielt dabei IL-10 [114].

Das RV bietet also gute Voraussetzungen, das immunogene bzw. immunmodulatorische Potenzial neurotroper Viren zu untersuchen. Durch rekombinante Virus-Versuchsmodelle konnte gezeigt werden, dass die Stärke der antiviralen Immunantwort die Pathogenität des Virus beeinflusst. So wurden beispielsweise rekombinante RV-Stämme generiert, in deren Genom das für das proinflammatorische TNF oder für das pro-apoptotische Cytochrom C kodierende Gen einkloniert wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Immunantwort (inklusive T-Zell-Infiltration und Mikroglia-Aktivierung) zu einer verminderten Virus-Ausbreitung und zu verminderter Pathogenität der Viren und Mortalität der infizierten Tiere führte, obwohl die Viren das ZNS bereits erreicht hatten [47, 143]. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Pathogenität des RV, neben anderen Faktoren, hauptsächlich von der Expression des RV-G abhängt [49]. Insofern kann eine Herunterregulierung der RV-G-Expressionsrate als eine virale Strategie angesehen werden, die Immunabwehr des Wirts zu umgehen; folglich ist die Pathogenität dieses Virus-Stammes gesteigert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll analysiert werden, inwiefern eine spezifische Variation des RV-G einen Einfluss auf die virale Replikationsrate, auf Expressionsraten immunogener Virus-Partikel, auf die virale Ausbreitung im ZNS oder auf lokale Immunreaktionen hat. Dazu verglichen wir eine experimentell induzierte Infektion mit dem RV-Stamm SPBN mit der eines Stammes, bei dem die komplette Glykoprotein-Gensequenz im Virus-Genom von SPBN durch die des hoch pathogenen Wildtyp-Stammes DOG4 ersetzt worden war [35], was im RV-Stamm SPBN-

DOG4 resultierte. Da sich die beiden Virus-Stämme SPBN und SPBN-DOG4 in ihrer Pathogenität und ihrer Neuroinvasivität bei peripherer intramuskulärer (i.m.) Infektion unterscheiden, benutzten wir die nicht-invasive intranasale (i.n.) Infektionsroute, welche es den Viren beider Stämme gleichermaßen ermöglichte, das ZNS direkt zu infiltrieren [95]. Durch die Nähe der Inokulationsstelle zum Gehirn hat diese Infektionsroute den Vorteil, dass keine lokalen Immunreaktionen oder das Hindernis der ersten Synapse die virale Invasion des Gehirns behindern.

2.2.2 Rabies-Virus-Antikörper

Dass eine Korrelation zwischen der Produktion spezifischer Virus-neutralisierender Antikörper (VNA) und der Abwehr einer RV-Infektion besteht, konnten Schumacher et al. bereits 1989 belegen [160]. Am wichtigsten scheinen dabei IgG-Antikörper zu sein, die gegen das RV-G gerichtet sind. Rabies-VNA wirken auf zweierlei Weise: Zum einen können sie den viralen Befall von Neuronen hemmen [37], zum anderen sind sie auch wirksam, wenn das Virus bereits eine Zelle befallen hat. Hierbei gibt es wiederum zwei verschiedene Mechanismen, die zur Eliminierung des Virus führen:

1. **Zytolytische Mechanismen:** Die klassischen viralen Clearance-Prozesse wie Komplement-vermittelte Zell-Lyse und Antikörper-(AK)-abhängige Zytotoxizität führen zur Destruktion der befallenen Zelle [69].
2. **Nicht-Zytolytische Mechanismen:**
 - Hemmung der Transkription viraler RNA [34]
 - Hemmung der Virus-Ausbreitung von Zelle zu Zelle
 - Induktion des antiviral wirksamen TNF- α in infizierten Zellen

Bleibt die VNA-Produktion aus, so sterben Mäuse im Tierversuch auch infolge einer Infektion mit einem stark attenuierten Virus-Stamm [70]. Andererseits kann auch die passive Immunisierung mit RV-spezifischen VNA protektiv wirken [33]

Entgegen der bisherigen Darstellung der Rolle der VNA bezüglich des Ausgangs einer RV-Infektion belegen neuere Publikationen die Wichtigkeit des Adaptorproteins MyD88, welches im Toll-Like-Receptor-(TLR)-Signalweg eine Schlüsselstellung einnimmt. Beschrieben ist dies u.a. bei einer Infektion mit Vesikulären Stomatitis-Viren (VSV), die dem Rabies-Virus genetisch sehr ähnlich sind. MyD88-k.o.-Mäuse starben infolge einer VSV-Infektion, obwohl der Signalweg zur Bildung von Antikörpern nicht beeinträchtigt war [100].

2.2.3 Mikroglia

Bei Mikroglia handelt es sich um residente Makrophagen des ZNS [32]. Sie exprimieren MHC-I- und MHC-II-Moleküle, können also als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei lokalen Immunreaktionen und sie können diverse neurotoxische Stoffe produzieren [59].

Bei einer experimentell in Mäusen ausgelösten Theiler's Virus-Infektion kommt es zu einer Myelin-spezifischen autoreaktiven Aktivierung CD4-positiver Th1-Lymphozyten. Diese aktivieren Mikrogliazellen und infolge der Infektion in das ZNS infiltrierende Makrophagen. Beide Zellarten, Mikroglia und infiltrierende Makrophagen, produzieren daraufhin das gleiche Muster an Effektor-Molekülen, nämlich IL-1, IL-6, IL-12 p40, TNF- α und iNOS (induzierbare NO-Synthase). Es konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen in gleicher Weise wie Makrophagen aktiviert werden und wie diese im Falle der Aktivierung infolge einer Virus-Infektion als Antigen-präsentierende Zellen fungieren [106].

Nach dem Priming durch Interferon- γ (IFN- γ), Lipopolysaccharid (LPS) oder Demyelinisierung erhöhen Mikrogliazellen die MHC-II-Expression sowie die Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen, sie prozessieren Antigen und stimulieren T-Lymphozyten [7, 55, 182]. Die durch IFN- γ stimulierten Mikrogliazellen können auch naive T-Lymphozyten aktivieren, jedoch weniger effizient als dendritische Zellen [6].

Mikrogliazellen sekretieren mehrere zytotoxische Substanzen wie z.B. freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid und Proteasen. Dennoch wirkt sich die Aktivierung von Mikrogliazellen offensichtlich prinzipiell neuroprotektiv aus [99, 166].

2.2.4 Astroglia

Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im zentralen Nervensystem von Säugetieren und stellen wichtige Stoffwechselfaktoren für Neurone bereit [136, 174]. Sie modulieren deren Ansprechbarkeit auf Neurotransmitter und sie beeinflussen die neuronale Erregbarkeit [139, 173]. Neurone in Kultur entwickeln nicht voll funktionsfähige Synapsen in der Abwesenheit von Gliazellen [137]. Astrozyten bilden im ZNS ein Synzytium – die Zellen sind durch Gap Junctions verbunden und elektrisch gekoppelt [151].

Morphologisch werden zwei Astrozyten-Populationen voneinander unterschieden: Typ-1 (polygonale) und Typ-2 (ausläufertragende) Astrozyten [43]. Ein gut untersuchter und gegen beide Zelltypen spezifischer Antikörper ist GFAP (glial fi-

brillary acidic protein) [15,45].

Astrozyten sind immunkompetente Zellen, die bei inflammatorischen Prozessen des ZNS durch Antigen-Präsentation und die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine eine wichtige Rolle spielen [42]. Sie sind bei unterschiedlichen lokalen Entzündungsreaktionen beteiligt; sie proliferieren infolge von viraler Infektion, Demyelinisierung sowie Trauma [117,122,128,149]. Bei Demyelinisierung infolge einer viralen Infektion synthetisieren Astrozyten Wachstumsfaktoren, die zur Myelin-Reparatur beitragen [116,149].

Astrozyten scheinen für die Mikroglia-Aktivierung eine Schlüsselrolle zu spielen. Dies ergibt sich aus Untersuchungen mit Infektionen durch das Borna-Virus (BDV) [129]. Weder das Virus allein noch infizierte Neurone können *in vitro* Mikrogliazellen in Abwesenheit von Astrogliazellen aktivieren [130].

Zudem bilden Astrozyten durch die Umscheidung von Blutgefäßen im ZNS durch ihre Endfüße einen Teil der Blut-Hirnschranke und sie stellen einen entscheidenden Faktor für deren Durchgängigkeit dar [2,58]. Die intakte Blut-Hirnschranke verhindert den Eintritt von im Blut zirkulierenden Proteinen und Zellen ins ZNS [59].

2.2.5 T-Lymphozyten

Die T-Zellen werden in die drei Gruppen der CD4-positiven (CD4+) T-Helfer-(Th)-Lymphozyten, die CD8-positiven (CD8+) zytotoxischen T-Lymphozyten sowie die regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) unterteilt. Die CD4+ Th-Lymphozyten werden weiter in Th0-, Th1- und Th2-Lymphozyten eingeteilt, wobei Th0-Lymphozyten wahrscheinlich Vorläuferzellen von Th1- und Th2-Lymphozyten sind [43]. Daneben existieren weitere Subtypen von CD4+ T-Lymphozyten.

Th1-Lymphozyten sekretieren v.a. IL-2, IFN- γ und TNF- β . Sie sind in die Beseitigung neurotroper Viren, in Virus-induzierte ZNS-Inflammation und Gewebestruktur involviert [123]; ihnen kommt eine proinflammatorische Rolle zu. Im Gegensatz dazu sind die Zytokine, die von Th2-Lymphozyten produziert werden (IL-4, IL-10 und IL-13) antiinflammatorisch wirksam; sie inhibieren damit ZNS-Inflammation und möglicherweise die zytotoxischen Effekte aktivierter Th1-Lymphozyten [123]. Es wird angenommen, dass das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Lymphozyten-Reaktion den Ausgang einer ZNS-Inflammation entscheidet [5].

Die Aktivierung von T-Lymphozyten im ZNS erfolgt durch die Antigen-Präsentation von den im ZNS ansässigen Antigen präsentierenden Zellen (APC); dabei handelt es sich um Gliazellen, namentlich Mikroglia, Astroglia und Dendritische Zellen. Durch IFN- γ stimulierte Mikroglia-Zellen können sehr viel effektiver die Th1-

und Th2-Lymphozytenproliferation und deren Zytokin-Sekretion in Gang setzen als Astrozyten [6, 7]. V.a. IL-12 scheint als Verstärker einer zielgerichteten Th1-Aktivierung entscheidend zu sein [5].

Bei der Antigen-spezifischen Interaktion zwischen APC und T-Lymphozyten regulieren sich beide Zelltypen gegenseitig [5]. IFN- γ ist essenziell für die Reifung ruhender Mikrogliazellen in APC sowie deren TNF- α -Expression [8]. TNF- α spielt eine Schlüsselrolle in der ZNS-Inflammation durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen und von Chemokinen im ZNS und in Gefäß-Endothelzellen.

Der Übertritt im Blut zirkulierender Leukozyten ins ZNS wird in der Regel durch die Blut-Hirnschranke, genauer gesagt durch die Tight Junctions des zerebellaren Kapillarendothels verhindert [21, 76]. Dennoch haben mehrere Studien gezeigt, dass aktivierte T-Lymphozyten routinemäßig im Sinne einer immunologischen Überwachungsfunktion die Blut-Hirnschranke überwinden [67, 76]. Ins ZNS übergetretene aktivierte T-Lymphozyten verweilen dort nicht ohne die Anwesenheit von Antigen – entweder verlassen sie das ZNS wieder oder sterben *in situ* [59]. Im Gegensatz dazu verbleiben T-Lymphozyten im ZNS, wenn ihnen Antigen mittels passenden MHC-Molekülen präsentiert wird [76].

2.2.6 Zytokine

Durch Abb. 5 soll zunächst einen Überblick über die Wirkungen der von uns gemessenen Zytokine geben werden. Im Anschluss werden die Zytokine dann dann genauer dargestellt.

Interferon- β (IFN- β). IFN- β wird von Neuronen und Gliazellen gleichermaßen produziert und ist das wichtigste Typ-1 Interferon des ZNS. *In vitro* wird IFN- β zur effektiven Induktion von IFN- α benötigt [46, 154]. Dennoch scheint die Produktion von IFN- β im ZNS trotz der Neurotoxizität von IFN- α neuroprotektiv zu sein [3, 110]. Die Ursache dafür mag in der zusätzlichen Induktion des neuroprotektiven IL-10 durch dendritische Zellen begründet liegen [74].

Experimentell konnte gezeigt werden, dass IFN- β das Zytokin-Expressionsmuster peripherer mononukleärer Zellen, d.h. von Th0-, Th1- und Th2-Zellklonen folgendermaßen verändert: Hochregulation von IL-4 und IL-10 sowie Herunterregulation von IL-5, IL-12, IL-13 und IFN- γ [132].

Neben der Wirkung auf T-Zellen hat IFN- β auch eine Wirkung auf Gliazellen:

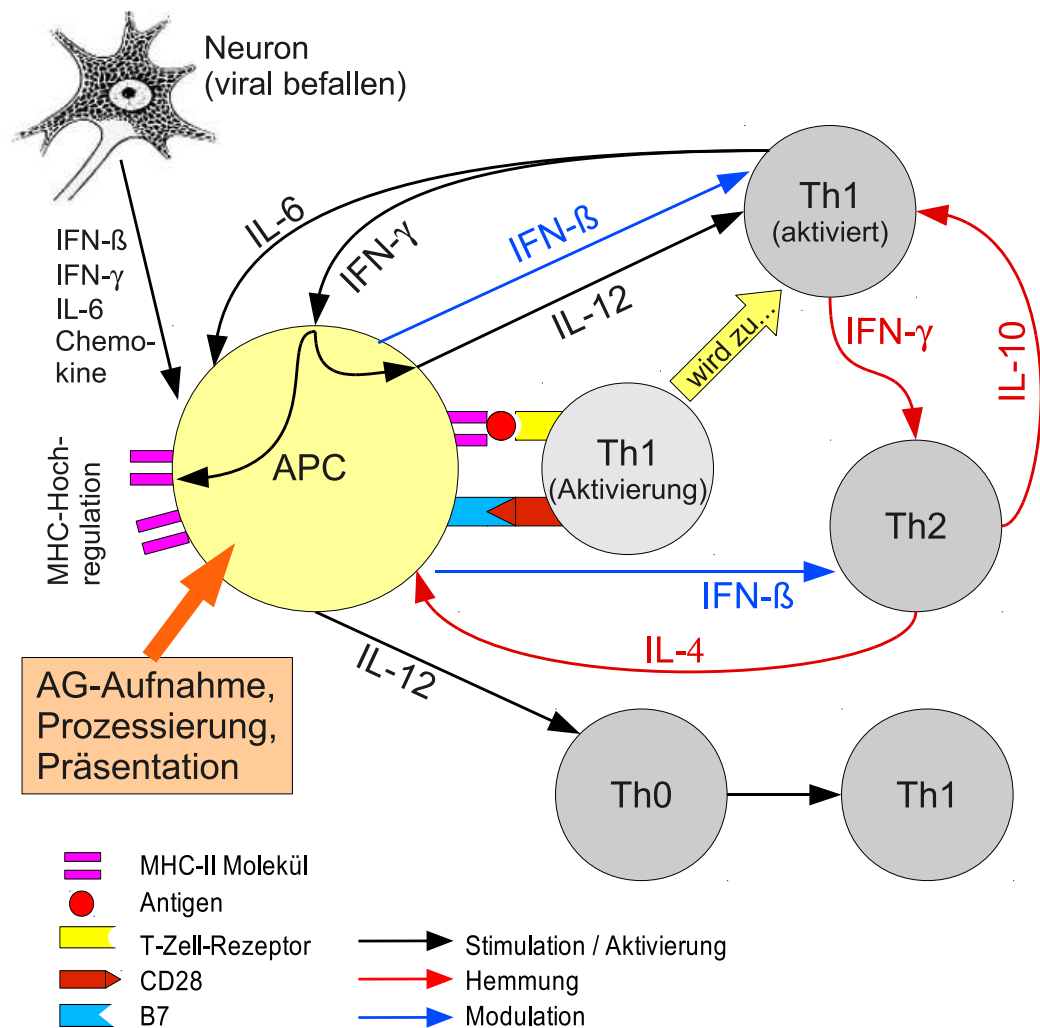


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Reaktionswege, die infolge von Antigen-Präsentation zur Aktivierung bzw. Hemmung von T-Lymphozyten führen. bei den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) handelt es sich um Mikroglia, Astroglia bzw. Dendritische Zellen. Orientiert an [101].

Werden solche mit IFN- β behandelt und dann in Ko-Kultur mit T-Zellen gebracht, so wird die Funktion der T-Zellen insofern gehemmt, als dass deren Syntheserate von IFN- β , TNF- α und Stickstoffmonoxid (NO) vermindert ist. Teige et al., welche diese Effekte beschrieben, vermuteten als Ursache eine durch IFN- β gehemmte Antigen-Präsentationsfähigkeit ZNS-spezifischer APC [169].

Geschädigte bzw. viral befallene Neurone senden Botenstoffe an Astrozyten und Mikroglia [125]. Zu diesen Botenstoffen zählen neben IFN- β die Zytokine IFN- γ und IL-6, die Chemokine Fraktalkin (CX3CL1) sowie das secondary lymphoid tissue chemokine (SLC, CCL21) [24, 63, 126, 147].

Interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ ist ein dimeres Glykoprotein, welches vor allem von aktivierten T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), in geringerem Maße aber auch von B-Lymphozyten sezerniert wird. IFN- γ ist der generelle Aktivierungsfaktor für mononukleäre Phagozyten. Zudem steigert es die Zytokinsynthese und aktiviert neutrophile Granulozyten sowie NK-Zellen [43]. Insofern handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin.

IFN- γ ist der wichtigste Regulator der APC. Es stimuliert die Synthese mehrerer Moleküle des MHC-I- und des MHC-II-Signalweges. Dadurch kommt es zu einer verstärkten AG-Präsentation und, bezogen auf den MHC-I-Signalweg, einer vermehrten Proteolyse nach intrazellulär aufgenommener Proteine und deren Transfer in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), was wiederum zu einer gesteigerten Antigen-Präsentation führt. Des weiteren erhöht IFN- γ die Syntheserate von MHC-I-Molekülen selbst [170] und verstärkt die Expression des kostimulatorischen Liganden B7.

Seit längerem ist bekannt dass IFN- γ ein entscheidender Faktor für die Pathogenese von experimentell induzierter Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) ist und ein Zusammenhang mit dem Ausmaß des klinischen Krankheitszustandes besteht [131]. Es wurde kurz nach dieser Entdeckung belegt, dass IFN- γ der Entstehung von EAE entgegenwirkt [90]. Als Ursache wird dafür aktuell die Fähigkeit von IFN- γ angesehen, die Expansion aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten im ZNS zu limitieren [26].

Hooper et al. konnten zeigen, dass Rabies-Viren vom Stamm CVS-F3 bei IFN- γ -Rezeptor k.o.-Mäusen in deren ZNS deutlich länger vorhanden sind als bei Wildtyp-Kontrolltieren. Sie beobachteten eine verzögerte, jedoch nicht verminderte VNA-Produktion [70].

Die Auswertung mehrerer Experimente an transgenen Mäusen legte die Vermutung nahe, dass IFN- γ zum einen als proinflammatorisches Zytokin im ZNS fungiert [177], zum anderen aber auch neurotoxische Eigenschaften aufweist, z.B. bei der Hirnentwicklung [28,44].

Interleukin-6 (IL-6). Interleukin-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und einer der wichtigsten Mediatoren von Fieber und der Akute-Phase-Reaktion. IL-6 wird u.a. von T-Zellen und Makrophagen sekretiert; im ZNS scheint aber Astroglia die Hauptquelle zu sein [176].

IL-6 wirkt hauptsächlich auf Astrozyten (autokrin) und Mikroglia, die durch chronische IL-6-Exposition aktiviert wird [20, 51]. Aber auch bei akuter fokaler

Schädigung des ZNS ist IL-6 von größter Wichtigkeit: Die Anzahl und das Ausmaß der Aktivierung von Makrophagen bzw. Mikroglia-Zellen sind in diesem Falle bei IL-6-k.o.-Mäusen stark erniedrigt [86, 134]. Infolge dieser verminderten Glia-Aktivierung und Entzündungsreaktion ist das Ausmaß der Gewebeschädigung bei den IL-6-k.o.-Mäusen schwerer als bei entsprechenden Kontrolltieren.

IL-6 ist zudem essenziell für das Überleben von Neuronen nach Ischämie [105] sowie für die Regeneration von Neuronen nach Axotomie [68]. Daraus kann gefolgert werden, dass IL-6 neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften ein neuroprotektives Potenzial besitzt und die Regeneration von Neuronen nach akuter Schädigung fördert [177]. Die neuroprotektive Wirkung von IL-6 liegt möglicherweise in seiner Fähigkeit begründet, eine schnelle proinflammatorische Reaktion gegen ein Antigen in Gang zu setzen [83], beispielsweise die IFN- γ -Produktion zu stimulieren und die Infiltration und Akkumulation von Lymphozyten im Gehirn Virus-infizierter Mäuse zu induzieren [177].

Interleukin-10 (IL-10). Generell sind neben den immunstimulatorischen auch die immunsuppressiven Mechanismen von großer Wichtigkeit, denn es können z.B. aktivierte Makrophagen schwere Gewebeschäden verursachen, wie dies bei Autoimmunerkrankungen beobachtet werden [118].

IL-10 zählt neben TGF- β zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen. Die antiinflammatorische Wirkung basiert auf deren Eigenschaft, die Induktion proinflammatorischer Zytokine zu limitieren [60].

IL-10 wird von CD4⁺ T-Lymphozyten gebildet. Es wirkt hemmend auf aktivierte Makrophagen [118], inhibiert die LPS-induzierte CD40-Genexpression [145] und schaltet das Immunsystem in einen „Ruhezustand“. Zudem hemmt IL-10 aktivierte Makrophagen und Dendritische Zellen [1]. Infolge dessen wird auch die Produktion von IFN- γ gehemmt [31, 159] und die Expression von MHC-II-Molekülen und Kostimulatoren wie B7 in Makrophagen wird gehemmt [1]. Zudem hemmt IL-10 die Proliferation Antigen-aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten und inhibiert die T-Zell Proliferation in gemischter Leukozyten-Kultur [175].

IL-10 k.o.-Mäuse entwickeln entzündliche Darmerkrankungen [94, 150], wahrscheinlich infolge der unkontrollierten Aktivierung von Makrophagen, welche durch enterische Mikroben aktiviert werden [150]. Außerdem sind IL-10 k.o.-Mäuse empfindlicher für LPS-Schockreaktionen [14]. Periphere Immuntoleranz wird durch regulatorische T-Zellen aufrecht erhalten, die nach Antigen-Stimulation IL-10 und / oder TGF- β produzieren.

Das antiinflammatorische Potenzial von IL-10 gab die Veranlassung zu klinischen Studien, in denen dieses Zytokin versuchsweise bei entzündlichen Darmerkrankungen, Rheumatoider Arthritis sowie Psoriasis eingesetzt wurde, bisher jedoch mit nur mäßigem Erfolg [9].

3 Material

3.1 Mäuse, Zellen & Viren

3.1.1 Mäuse

Bei den Black 6-Mäusen handelte es sich um weibliche 6-8 Wochen alte Tiere vom Stamm C57BL/6J. Quelle: The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

3.1.2 Viren

Bei dem rekombinanten Rabies-Virus SPBN handelt es sich um einen cDNA-Klon, der aus dem Stamm SAD B19 (Street Alabama Dufferin B19) generiert worden war [157]. Der SPBN-DOG4-Stamm wurde von Frau Mirjam Bertoune am selben Institut hergestellt. Als Basis wurde dabei der SPBN-Stamm verwendet, dessen für das Glykoprotein kodierende Gensequenz gegen die des Wildtyp-Stammes DOG4 ausgetauscht wurde.

3.1.3 Zellen.

Neuroblastoma NA Zellen von A/J Mäusen (The Jackson Laboratory). Sie wurden bei 37°C in mit 10% FBS angereichertem RPMI 1640 Medium gezüchtet.

3.2 Oligonukleotide

RNA	Sequenz	AT	Hersteller	Katalog-Nr.	Bemerkung
Maus IFN- β 1	Kommerziell; vom Hersteller nicht bekannt gegeben.	60°C	SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA	PPM03594B	
Maus IFN- γ				PPM03121A	
Maus IL-6				PPM03015A	
Maus IL-10				PPM03017B	
RNP	S: 5'-AGA AGG GAA TTG GGC TCT G-3' AS: 5'-TGT TTT GCC CGG ATA TTT TG-3'	60°C	Sigma Genosys (eine Gruppe von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)		Rabies N-Protein
18s RNA	S: 5'-GGG GAA TCA GGG TTC GAT-3' AS: 5'-GGC CTC GAA AGA GTC CTG TA-3'				interne Referenz

Alle Oligonukleotide wurden mit *ddH₂O* verdünnt, so dass sie in einer Verdünnung von 100pmol/ μ l vorlagen. Diese Lösungen wurden dann verwendet, um 2 μ M Verdünnungen herzustellen: Jeweils 2 μ l des Sense-Primers und 2 μ l des entsprechenden Antisense-Primers wurden mit 96 μ l *ddH₂O* verdünnt.

3.3 Chemikalien

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
Ammonium-Nickel-Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (ehem. Fluka), Buchs, Schweiz	09885
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA	D5637
Eisessig (Essigsäure 100% wasserfrei zur Analyse)	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland	1.00063.2511
Formaldehydlösung (Formaldehyde 37% Solution)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA	F-1635
Kupferacetat (Copper(II) acetate monohydrate, 98+%, A.C.S. reagent)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA	217557
Opti Pro TM SFM (Serum Free Medium)	Gibco	12309-019
Pikrinsäure (Picric Acid, reagent grade, 98% in 35% Wasser)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA	197378
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	03115879001
RNAlater TM RNA Stabilization Reagent	Qiagen Sciences, Maryland, USA	76106
TESAP (3-(Triethoxysilyl)propylamin zur Synthese; $C_9H_{23}NO_3Si$)	Merck Schuchardt GmbH, Hohenbrunn, Deutschland	8.21619.0500
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3580.1
2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	6752.5
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9090.3
Triton X-100 (t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA	234729

3.3.1 Perfusionslösungen

Immunhistochemisch zu färbende Gewebe wurden primär mittels Fixationslösung perfundiert; verwendet wurde hierzu Bouin/Hollande-(B/H)-Lösung sowie zwei Spüllösungen.

- Herstellung von 500ml Bouin/Hollande Stammlösung:
 1. 12,5g Kupferacetat werden in 250ml Wasser gelöst.
 2. Hinzugefügt werden 30g Pikrinsäure.
 3. Die Lösung wird zu 500ml mit Wasser aufgefüllt und die Komponenten unter Rühren gelöst.
 4. Filtration der Lösung mit Nalgene-Filtersystem (Porengröße $0,2\mu\text{m}$).

Die Lösung wurde im Kühlschrank bei ca. 4°C aufbewahrt (Haltbarkeit 3-4 Monate).

- Bouin/Hollande Gebrauchslösung: 100 Teile Bouin/Hollande Stammlösung + 10 Teile Formaldehydlösung 37%ig säurefrei + 1 Teil Eisessig
- Spüllösung I: DPBS + 20.000 IE Heparin pro Liter.
- Spüllösung II: DPBS

Für die Immunhistochemischen Färbungen wurde PBS 50mM benötigt; dabei handelt es sich um einen Phosphatpuffer. Er wurde folgendermaßen hergestellt (Ansatz für 1 Liter):

- 1,31g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$
- 7,21g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 9,0g NaCl

Diese Salze wurden in 900ml Aqua bidest unter Rühren gelöst. Dann wurde der pH auf 7,45 eingestellt, sodann mit Aqua bidest auf 1 Liter aufgefüllt.

3.4 Medikamente

Handels-name	Wirkstoff	Hersteller	Katalog-Nr.
Heparin Sodium inj., USP	Heparin	Baxter Healthcare Corp, Deerfield, USA	0641-0410-21
Isoflurane, USP	Isoflurane	Webster Veterinary Supply, Inc.	1-800-225-7911
Ketamine HCl	Ketamine HCl (50mg/ml)	Hergest. für Bedford Laboratories TM , Bedford, USA	55390-475-10
Xylazine hydrochloride	Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA	23076-35-9

3.5 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Realtime-PCR Thermocycler	ABI Prism [®] 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Nalgene [®] Filtersystem für Flüssigkeiten	75mm Filter unit - 500ml (Filter: Nylon-Membran 0,2µm Porengröße; 151-4020)	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Gewebe-Homogenisierer	Omni handheld TH Tissue Homogenizer	Omni International, Marietta, GA, USA
Lupenbrille (3.0×)	Labo-clip binocular (164630)	Eschenbach Optik GmbH, Nürnberg, Deutschland
Peristaltikpumpe	Minipuls 3	Gilson, Inc. Middleton, WI 53562, USA
Wärmeplatte für Objektträger	WT-13	MEDAX Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Mikrotom	HM 325	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
UV-Photospektrometer	UV-1610	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Gewebe-Einbettautomat	Tissue-Tek® VIP	VOGEL, Medizinische Technik und Elektronik, Gießen, Deutschland
Waage zur Bestimmung des Körpergewichts der Mäuse	Adventurer Pro AV212	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA
Zentrifuge für Eppendorf-Cups, gekühlt	Hettich Zentrifuge Mikro 22R, Rotor 1195-L (r=87mm)	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge für Eppendorf-Cups	Hettich Zentrifuge Mikro 20, Rotor 2073 (r=86mm)	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer, Waltham, USA
Brutschränke	HERAcell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskop	Olympus Provis AX70	Olympus Optical co., Ltd, Tokyo, Japan
Kamera für das Zeiss-Mikroskop	ProgRes® CF scan	Jenoptik Laser, Optik, Systeme GmbH, Jena, Deutschland
Kamera für das Olympus-Mikroskop	SPOT RT Slider 2.3.1	Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA
Laser Scanning Mikroskop (LSM)	Olympus BX50WI	Olympus Optical co., Ltd, Tokyo, Japan
Laser für das LSM	Omnichrome® Series 43, Modell 643-OLYM-A03	Melles Griot Laser Group, Carlsbad, CA, USA

3.6 Software

Name & Version	Beschreibung	Hersteller / URL
OpenOffice.org 2.0.4	Office-Suite	http://www.openoffice.org
Vector NTI Advance 10.3.5	PCR-Primer-Designer und Verwaltung	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Gnuplot 4.2	Daten-Visualisierung	entwickelt von Thomas Williams, Colin Kelley et al.
GraphPad Prism 5	Statistik-Software	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Gimp 2.2.10	Bildbearbeitung	http://www.gimp.org
L ^A T _E X 2 _ε	Textsatz	http://www.latex-project.org
MCID Elite	Digitale Fotoauswertung / Quantifizierung	InterFocus Imaging Ltd, Linton, Cambridge, England (http://www.mcid.co.uk)
SPOT Elite 3.5.7.1	Steuerung der SPOT-Kamera	Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA (http://www.diaginc.com)
Jabref 2.3	Literaturdatenbank	http://jabref.sourceforge.net
LightCycler 5.32	Steuerung des Realtime-PCR-Thermocyclers ABI Prism [®] 7000	Roche Applied Science
ProgRes CapturePro 2.5	Software für die Jenoptik ProgRes [®] Kamera	Jenoptik Laser, Optik, Systeme GmbH, Jena, Deutschland
Fluoview 2.1.39	Steuerung des Olympus LSM	Olympus Optical co., Ltd, Tokyo, Japan

3.7 Reaktions-Kits

- Avidin/Biotin Blocking Kit
Hersteller: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Katalog-Nr.: SP-2001
- Vectastain Elite ABC Kit
Hersteller: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Katalog-Nr.: PK-6100
- RNase-Free DNase Set
Hersteller: Qiagen Sciences, Maryland, USA

Inhalt:

- DNase I, RNase-frei (lyophilisiert)
- Buffer RDD
- RNase-freies Wasser

Katalog-Nr.: 79254

- Omniscript RT Kit

Hersteller: Qiagen Sciences, Maryland, USA

Inhalt:

- Omniscript reverse transcriptase
- 10× Buffer RT
- dNTP (5mM von jedem dNTP)
- RNase-freies Wasser

Katalog-Nr.: 205113

- RNeasy® Mini Kit

Hersteller: Qiagen Sciences, Maryland, USA

Inhalt:

- RNeasy mini spin columns
- Collection tubes (1,5ml / 2ml)
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-freies Wasser
- Handbuch (6/2001)

Katalog-Nr.: 74106

- RT² ProfilerTM PCR Array System

Hersteller: SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA

Das in unserem Labor verwendete Paket bestand aus folgenden einzeln erhältlichen Kits desselben Herstellers:

1. RT² First Strand Kit

Inhalt:

- 5× gDNA Elimination Buffer
- 5× Reverse Transcription Buffer
- RT Enzyme Mix 3
- Primer und External Control Mix
- RNase-freies Wasser

Katalog-Nr.: C-03

2. RT² SYBR Green / ROX qPCR Master Mix

Inhalt:

- 1,4ml 2X solution (für 100 25 μ l Reaktionen)

Katalog-Nr.: PA-012

Handbuch: Version 3.0 (August 2007)

- *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD

Hersteller: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Inhalt:

- Enzyme solution (TdT)
- label solution (fluorescein-dUTP)
- Converter POD (anti-fluorescein antibody-POD)

Katalog-Nr.: 1 684 817

3.8 Antikörper

3.8.1 Primärantikörper

Bez.	Beschreibung	Donor-Spezies	Quelle	Katalog-Nr.	Verdünnung
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Gliazellmarker)	Meerschweinchen	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland	GP 52	1:3000
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide (Neuropeptid)	Kaninchen	Fred Nyberg / Stefan Persson; Universität Uppsala, Schweden		1:120.000
CD3	T-Zell Antigen Rezeptor (T-Zell-Marker)		Dako Deutschland GmbH, Hamburg	A452	1:2500
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Mikrogliazellmarker)		Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan	019-19741	1:3000
RNP	Rabies Nukleokapsid-Protein		Dietzschold, Thomas Jefferson University Philadelphia, PA, USA		1:3000
RV-G	Rabies Glykoprotein				1:3000
Rabies NMA802-3	Rabies-Marker (RV N)	Maus			1:250
LC3B	Autophagosomen-Marker	Kaninchen	Cell Signaling Technology, inc., Boston, MA, USA	2775	1:400

3.8.2 Sekundärantikörper

Je nach Donor-Spezies der Primärantikörper musste ein entsprechenden Sekundärantikörper eingesetzt werden. Diese stammten von MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland. Eingesetzt wurden die folgenden Antikörper in einer Verdünnung von 1:200:

- Affe-anti-Kaninchen IgG, biotinyliert (Best.-Nr.: 711-065-152)
- Affe-anti-Meerschweinchen IgG, biotinyliert (Best.-Nr.: 706-065-148)
- Huhn-anti-Maus IgG, Alexa Fluor 647-gekoppelt (best.-Nr.: A-21463)

3.9 Sonstige Reagenzien, Medien etc.

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
8-tube thermo-strips und ultra clear caps	Thermo Fisher Scientific Inc.	AB-1183
Albumin solution from bovine serum, 30% in DPBS	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA	A9576
Cellgro® DPBS, 1x (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)	Mediatech, Inc. Herndon, PA, USA.	21-031-CV
Cellgro® Penicillin-Streptomycin solution	Mediatech Inc., Herndorn, PA, USA	30-002-CI
Cellgro® RPMI, with L-Glutamine, 1640, 1×	Mediatech Inc., Herndorn, PA, USA	10-040-CV

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Cellgro® Trypsin EDTA, 1x (0,05% Trypsin / 0,53mM EDTA in HBPS)	Mediatech, Inc. Herndon, PA, USA	25-052- CI
DePeX	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	18243
dNTP-Mix (10mM)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland	20-2010
Dünne Glaskapillaren zur rettroorbitalen Blutentnahme (Micro-Hematocrit Cappilary Tubes)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA 15219, USA	22-362- 574
F96 MicroWell TM Plates (un- behandelt)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark (http://www.nuncbrand.com)	269620
Fetal Bovine Serum (FBS)	U.S. Bio-Technologies Inc., Parker Ford, PA, USA	
FITC-(Fluorescein)- konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	MP Biomedicals, Solon, OH, USA	55493
Fluor-Safe (Fluorescent Mounting Medium)	DakoCytomation, Inc., Carpinteria, California, USA	S3023

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Humanes Anti-Rabies Immunoglobulin, WHO-Standard	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters bar, Hertfordshire EN6 3QG, United Kingdom (UK)	
Immunfluoreszenzmarkiertes Streptavidin Alexa Fluor® A488	Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA	S11223
Objektträger (Menzel-Gläser 76x26mm, ISO 8037/1)	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig	021102
Pap-Pen (Super PAP-PEN)	Immunotech, a Beckman Coulter Company	IM3580
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen Sciences, Maryland, USA	76104
StatSampler Micro Blood Collectors (untreated tubes & capillary tubes). Inhalt: Dicke Glaskapillaren (Katalog-Nr. CU2C) und zentrifugierbare Röhrchen (Katalog-Nr. SS2U) für die Entnahme kleiner Blutmengen (ca. 200µl)	Iris Sample Processing, A Division of IRIS International, Inc. Westwood, USA	

4 Methoden

Die Tierversuche mit Rabies-Viren der Stämme SPBN- bzw. SPBN-DOG4 führten wir am Department of Microbiology and Immunology in Philadelphia in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Dietzschold durch.

4.1 Lagerung von Proben

Gewebe in Fixationslösung oder Paraffin wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. cDNA, Primär- sowie Sekundärantikörper wurden bei -20°C , Serumproben bei $+4^{\circ}\text{C}$ und RNA-Proben bei -70°C gelagert. Die Lagerung der in Opti Pro suspendierten Viren sowie der für den Neutralisationstest benötigten NA-Zellen erfolgte am Department of Microbiology and Immunology in Philadelphia bei -73°C . Reaktionskits und sonstige Reagenzien wurden nach Herstellerangaben aufbewahrt.

4.2 Infektion der Mäuse

Die Infektion der Mäuse wurde intranasal (i.n.) vorgenommen. Dazu wurden sie in eine Kammer gesetzt, in welche dann Isofluran eingeleitet wurde. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurden sie einzeln herausgenommen und es wurde ihnen mittels einer Pipette in jedes Nasenloch $10\mu\text{l}$ Virus-Lösung (insgesamt $20\mu\text{l}$ pro Maus) verabreicht. Dies entspricht einer inokulierte Virus-Menge von 2×10^5 Kolonien bildenden Einheiten (cfu) pro Maus.

4.3 Festlegung des Abbruchkriteriums

Um den Tag zu bestimmen, an dem die Tiere getötet werden sollten, wurden zunächst jeweils 5 Mäuse mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infiziert. In den folgenden Tagen wurden ihr Verhalten, der Krankheitszustand und ihr Körpergewicht als objektivierbares Kriterium für ihren Gesundheitszustand dokumentiert.

In den ersten Tagen waren keinerlei Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere zu sehen. Es wurde ein mittlerer Zuwachs des Körpergewichts um ca. 6% aufgezeichnet,

der bei beiden Gruppen gleich war. Erst am Tag 7 p.i. wurde ein deutlicher Abfall des mittleren Körpergewichts der SPBN-Gruppe sichtbar, der bis zum Tag 9 p.i. progredient war. Ebenfalls am 7. Tag p.i. wurde ein mäßiger Abfall des mittleren Körpergewichts der mit SPBN-DOG4 infizierten Mäuse registriert. Der Verlust von Körpergewicht war ebenfalls progredient, jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den mit SPBN infizierten Tieren (siehe Abbildung 6).

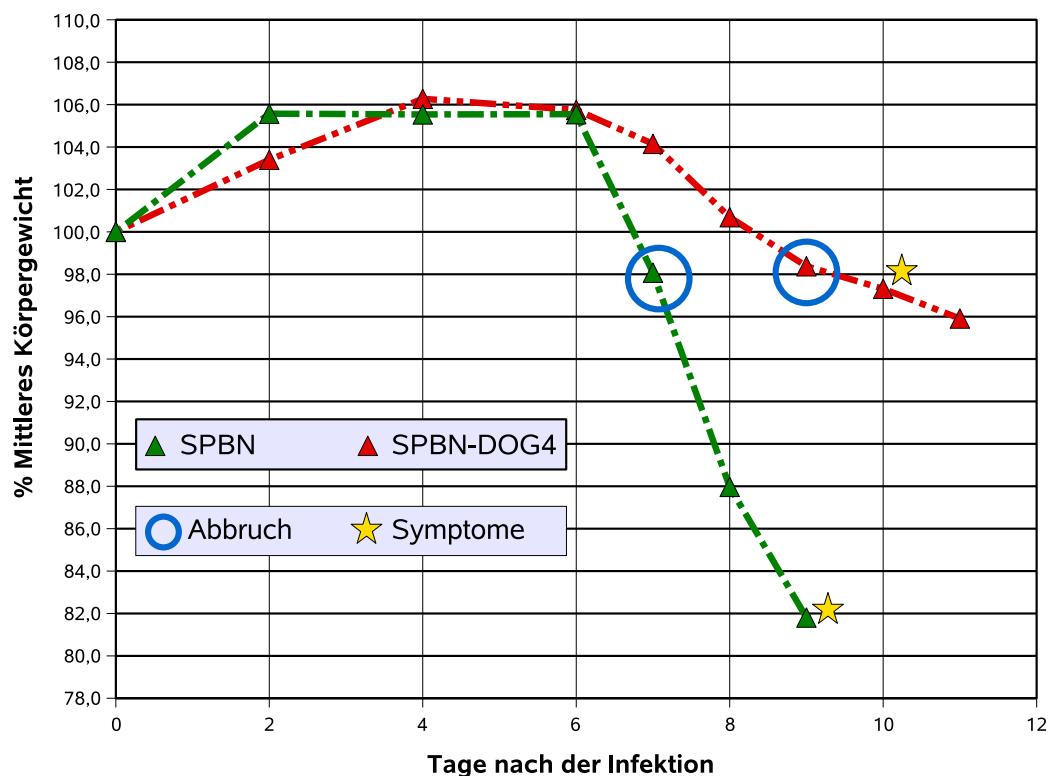


Abbildung 6: Vorläufige Gewichtskurve mit 5 Tieren pro Gruppe. „Symptome“ bezeichnet in dieser Grafik das Vorhandensein von deutlichen Krankheitssymptomen, wobei die Mäuse in diesen Stadien bereits moribund waren. „Abbruch“ bezeichnet den Zeitpunkt, an dem für die weitere Versuchsreihe die Tötung der Tiere geplant wurde.

Bereits am 7. Tag p.i. zeigten sich bei allen Mäusen Verhaltensauffälligkeiten. Sie schienen beim Öffnen der Käfige panischer als gewohnt. Infolge einer beginnenden Parese der Wadenmuskulatur präsentierten die Tiere einen watschelnden Gang. Am folgenden Tag vollzogen sie gyriforme Bewegungen der Hinterläufe, wenn sie am

Schwanz aus dem Käfig gehoben wurden. Am Tag 9 p.i. präsentierten alle Tiere der SPBN-Gruppe deutliche Krankheitszeichen. Sie waren dehydriert (mager und sehr schlaffe Haut); sie saßen apathisch und in sich zusammengekauert (einzeln anstatt als Gruppe auf einer Stelle) in ihren Käfigen. Das Fell war verschwitzt und stand zu Berge (s. Abb. 7). Beim Öffnen der Käfige zeigten die Mäuse keine Fluchtreaktion, wie sonst üblich. Beim Herausheben aus dem Käfig ließen sie die Gliedmaßen schlaff herabhängen anstatt wie üblich nach dem Käfigrand oder nahen Gegenständen zu greifen. Da wir in Zusammenschau mit dem massiven Verlust an Körpergewicht nicht erwarteten, dass sie bis zum nächsten Tag überleben würden, wurden sie noch am selben Tag getötet.

Zur selben Zeit waren in der Gruppe der mit SPBN-DOG4 infizierten Tieren noch keine Krankheitssymptome erkennbar. Erst am 10. Tag p.i. zeigten zwei der Mäuse die oben beschriebenen Symptome des Endstadiums und wurden ebenfalls getötet. Dasselbe geschah am 11. Tag p.i. mit den verbleibenden 3 Tiere der SPBN-DOG4-Gruppe, welche nun auch das Endstadium der Krankheit erreicht hatten (siehe Abbildung 6).

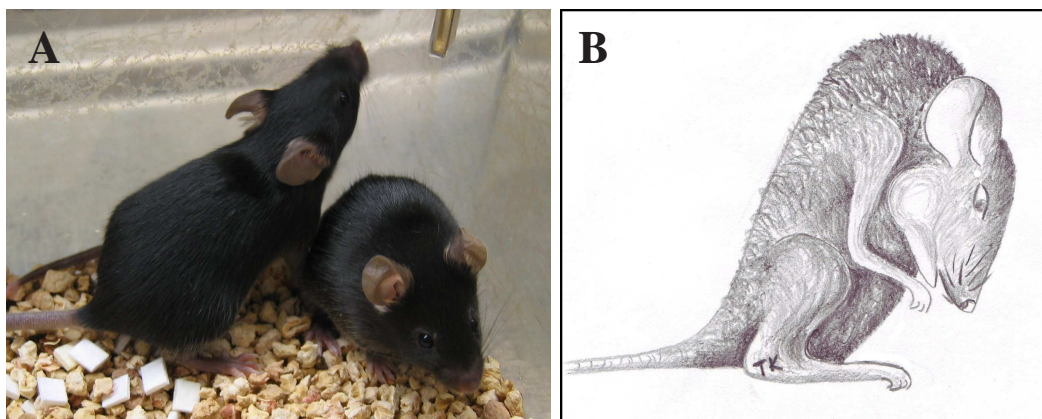


Abbildung 7: A: Gesunde C57BL/6-Mäuse. B: Schematische Darstellung des Erscheinungsbildes einer kranken Maus im Endstadium.

Anhand dieser Daten entschieden wir nun, dass wir die Mäuse im folgenden experimentellen Verlauf dann töten würden, wenn sie bereits einen deutlichen Gewichtsverlust aufweisen, jedoch noch nicht so krank sind, dass sie die Symptome des Endstadiums präsentieren; zudem sollten sie einen vergleichbaren Verlust an

Körpergewicht aufweisen. Für die Tiere der SPBN-Gruppe wählten wir deshalb den 7. Tag p.i., für die Tiere der SPBN-DOG4-Gruppe den 9. Tag p.i.

4.4 Bestimmung des VNA-Titers

Zur Bestimmung des Virus-spezifischen Antikörper-(VNA)-Titers im Serum wurde den Mäusen jeweils an dem Tag, an dem sie getötet wurden Blut entnommen und daraus Serum-Proben extrahiert. Diese wurden dann verwendet, um den Antikörpertiter mittels Antikörper-Neutralisationstest (RFFIT, rapid fluorescent focus inhibition test [165]) zu bestimmen. Der RFFIT wird von der WHO als Standardmethode zur Titerbestimmung von RV-spezifischen Antikörpern angesehen [187].

4.4.1 Blutentnahme

Zur Gewinnung von Serumproben führten wir eine retroorbitale Blutentnahme durch („Eyebleding“). Dazu wurden die mit Isofluran anästhesierten Mäuse bäuchlings auf eine feste Unterlage gelegt und das Augenlid mit Daumen und Zeigefinger gespreizt. Sodann wurde die Hälfte einer dünnen Glaskapillare (Fisher Scientific) von medial her in das Augenlid eingeführt und unter Rotation vorsichtig unter das Auge vorgeschoben. Sobald der Sinus orbitalis perforiert war, füllte sich die Kapillare mit Blut. Eine dicke Glaskapillare (Iris Sample Processing) wurde an die erste gesetzt, mit der nun 200 μ l Blut gesammelt werden konnten. War diese vollständig gefüllt, wurde die Kapillare entfernt und das Auge mit einem Tupfer in die Orbita zurück gedrückt, woraufhin eine schnelle Blutstillung erfolgte.

Das Blut aus der Kapillare wurde in zentrifugierbare Serumröhrchen (Iris Sample Processing) gegeben und dieses in einer aktiv kühlenden Zentrifuge zentrifugiert (12min bei 15°C und 5000RPM; beim verwendeten Rotor entspricht dies 2432 \times g). Anschließend wurde das überstehende Serum mit einer Pipette abgenommen, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und diese bei +4°C gelagert.

4.4.2 Herstellung einer Zellsuspension.

Zwei Kulturflaschen, in denen NA-Zellen (s. Abschnitt 3.1.3) bei -70°C gelagert worden waren, wurden aufgetaut und mit je 10ml Cellgro® DPBS (Mediatech Inc.) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1,3ml 0,05% iger Trypsin-Lösung für 30sek bei 37°C inkubiert, um sie in Suspension zu bringen. Der Inhalt beider Flaschen wurde anschließend zusammengeführt und mit einem sterilen Rührer vorhandene Klumpen zerkleinert. Von dieser Zellsuspension wurden dann pro vorzubereitendem 96-Well-Platte (Kulturplatte 1) 2ml Zellsuspension mit 9ml Kulturmedium (Mischung aus 500ml Cellgro® RPMI 1640 (Mediatech Inc.), 5ml Cellgro® Penicillin-Streptomycin (Mediatech Inc.) und 55ml FBS (U.S. Bio-Technologies Inc.)) verdünnt. In jedes Well (Vertiefung der Kulturplatte) wurden davon 100µl pipettiert und die Kulturplatten für 48 Std. bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wuchsen die Zellen und bildeten einen Zellrasen auf dem Boden der Wells.

4.4.3 Vorbereitung der Viren.

Das Serum der Mäuse wurde in der ersten Reihe von Nuclon 96 Well-Platten (Kulturplatte 2) 1:10 verdünnt. Dazu wurden 54 μ l Medium, bestehend aus RPMI 1640 Medium, 0,2% BSA und Penicillin-Streptomycin-Lösung (Mediatech), vorgelegt und

je 6 μ l Serum bzw. 6 μ l WHO-Standardisiertes humanes Immunglobulin (2IE/ml, s. Abschnitt 3.9) hinzu pipettiert. In den restlichen Wells wurden je 100 μ l Medium vorgelegt und sodann eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem jeweils 50 μ l, beginnend von der das Serum beinhaltenden Reihe, in die folgende Reihe überführt wurde (s. Abb. 8). Für jede Serum-Probe wurden zwei Verdünnungsreihen hergestellt (Verdünnungsfaktoren: 10, 30, 90, 270, 810, 2430, 7290, 21870).

Als Testviren dienten uns Rabies-Viren vom Stamm CVS-11, die vorverdünnt in jedes Well pipettiert wurden (je 10 μ l, das entspricht $10^{5,6}$ cfu pro Well). Die Kulturplatten wurden anschließend für 60min bei 37°C und 5% CO_2 -Konzentration inkubiert.

4.4.4 Infektion der Zellen.

Die in der Kulturplatte 1 vorbereiteten Zellen wurden dem Inkubator entnommen und das Kulturmedium abpipettiert. Anschließend wurde der Inhalt der Serum/Virus-Platten (Kulturplatte 2) in die Kulturplatte 1 transferiert. Es folgte eine Inkubation der Kulturplatte 1 für 24h bei 34°C und 5% CO_2 -Konzentration. Abb. 9 stellt das Prinzip des Antikörper-Neutralisationstests vereinfacht dar.

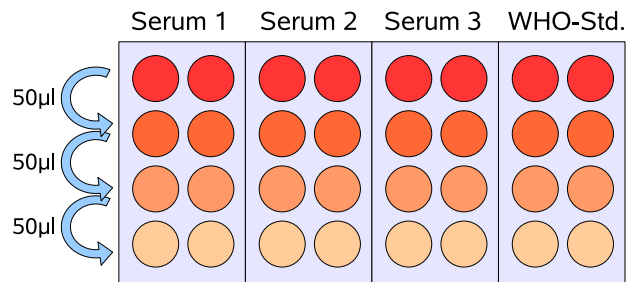


Abbildung 8: Vereinfachtes Schema der Herstellung der Serum-Verdünnungsreihe auf einer Kulturplatte.

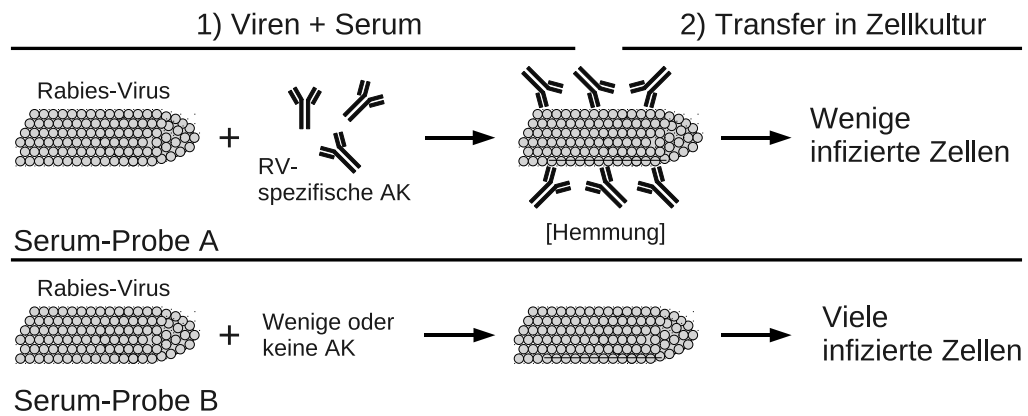


Abbildung 9: Prinzip des Antikörper-Neutralisationstests. Eigene Darstellung, orientiert an einer Grafik aus [41].

4.4.5 Färbung.

Nach der Inkubation wurde das Kulturmedium vorsichtig abpipettiert und jeweils $150\mu\text{l}$ gekühltes Aceton zwecks Fixation in die Wells der Kulturplatten gegeben. Die Zellen wurden damit für 30min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Aceton ausgeschleudert und die Platten bei RT getrocknet. Dann wurden pro Well $70\mu\text{l}$ FITC-anti-IgG-Farbstoff (MP Biomedicals) zugegeben und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Farbstoff markierte durch die Anlagerung an IgG selektiv RV-infizierte Zellen.

4.4.6 Auswertung.

Am folgenden Tag wurden die Platten ausgewertet. Dazu wurde zuerst der Farbstoff ausgeschleudert. Anschließend wurde unter mikroskopischer Sicht die Prozentzahl der infizierten Zellen geschätzt. Als Referenz diente dabei der WHO-Standard (Humanes Anti-Rabies Immunglobulin nach WHO-Standard, s. Abschnitt 3.9). Aus den aufgezeichneten Werten wurden dann die Verdünnungsfaktoren jeder Probe bei 50% infizierten Zellen ausgelesen. Da bekannt war, dass der WHO-Standard bei einer Infektionsrate von 50% der Zellen 2IE Immunglobulin entspricht, konnte die Menge an VNA für jede Serum-Probe bei 50% Infektionsrate durch folgende For-

mel berechnet werden:

$$2 \times \frac{\text{Verdünnungsfaktor der Serum-Probe bei 50\% Infektionsrate}}{\text{Verdünnungsfaktor des WHO-Standards bei 50\% Infektionsrate}}$$

Tabelle 5 zeigt beispielhaft Aufnahmen der NA-Zellen (100-fache Vergrößerung); der in den infizierten Zellen gebundene Farbstoff fluoresziert grün (Aufnahmen mit Zeiss Axiovert 40 CFL und Jenoptik ProgRes® CF scan).

4.5 Gewebefixierung mittels Perfusion

Um optimale immunhistochemischen Färbungen zu erzielen, wurde das Gewebe mit Bouin-Hollande-(B/H)-Lösung fixiert. Diese Fixation der Organe geschah mittels Perfusion, d.h. die Fixationslösung wurde ins Kreislaufsystem der Mäuse gespritzt, um alle Gewebe gleichmäßig und schnell zu fixieren. Bis zum Beginn der Perfusion musste das Kreislaufsystem der Maus aufrecht erhalten werden, d.h. die Perfusion wurde am schlagenden Herzen begonnen. Andernfalls hätte der Stillstand des Blutflusses eine intravaskuläre Gerinnung des Blutes zur Folge gehabt; eine Perfusions-Fixation wäre dann nicht mehr möglich gewesen, weil Teile des Kreislaufsystems durch Koagel verlegt wäre.

4.5.1 Narkose der Tiere

Zur Einleitung der Narkose verwendeten wir eine Mischung aus Ketamin (1mg/ml) und Xylazin (50mg/ml) im Mischungsverhältnis 10:1. Pro Tier verabreichten wir 0,1ml i.p. Bevor mit der Präparation begonnen wurde, testeten wir den Tail-Flick und den Korneareflex um die Wirkung der Narkose zu objektivieren.

4.5.2 Technische Vorbereitung

Ein Schlauchsystem wurde in die Perfusionspumpe eingebaut und mit den verschiedenen Perfusionslösungen (s. Abschnitt 3.3.1) gefüllt. Abklemmen der Schläuche verhinderte eine Vermischung inkompatibler Lösungen.

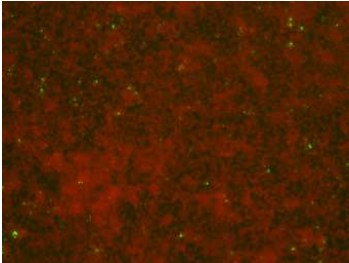
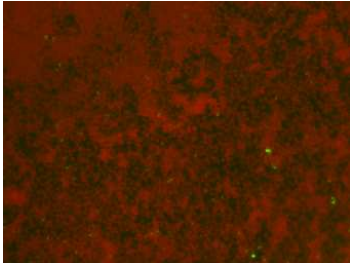
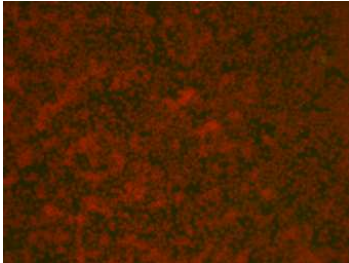
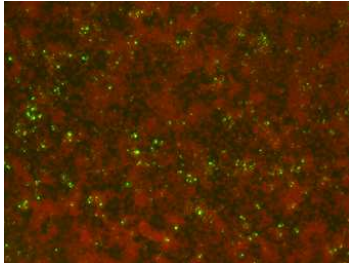
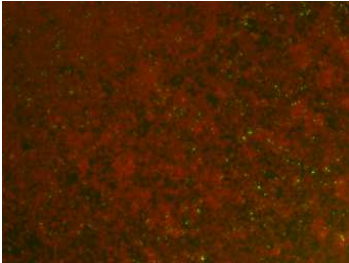
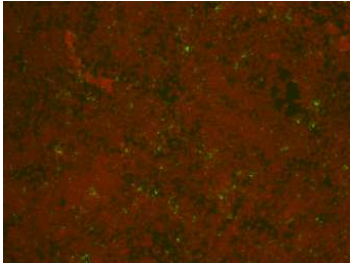
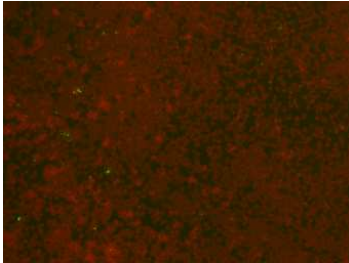
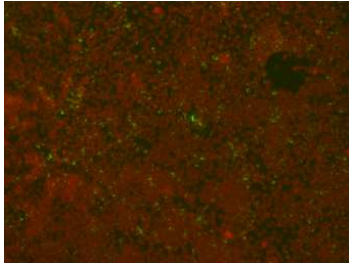
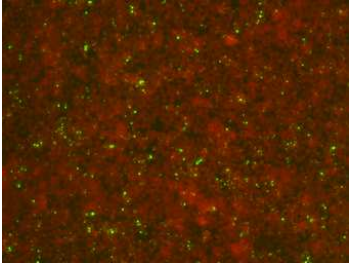
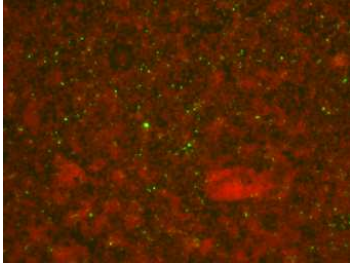
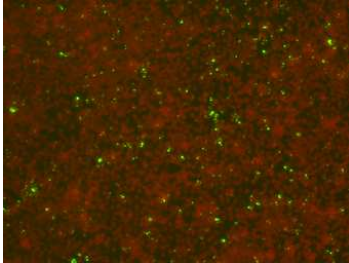
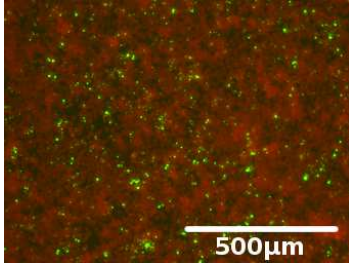
Neutralisationstest				
Serum-Verd.	SPBN	SPBN-DOG4	WHO-Standard	Kontrolle
1:30				
1:270				
1:2430				

Tabelle 5: Antikörper-Neutralisationstest: Repräsentative Aufnahmen der NA-Zellen. Grüne Fluoreszenz in RV-infizierten Zellen.

Zuerst musste das Blut ausgewaschen werden, weil es sonst mit der Fixationslösung Präzipitate gebildet hätte. Dies geschah im ersten Schritt mit einer mit Heparin angereicherten DPBS-Lösung (Mediatech, Inc.), um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Diese Lösung musste dann ebenfalls ausgewaschen werden, da die B/H-Fixationslösung auch mit Heparin Präzipitate bilden würde. Dazu wurde im zweiten Schritt reines DPBS verwendet. Anschließend wurde die B/H-Fixationslösung in das Gefäßsystem der Maus injiziert.

4.5.3 Präparation und Perfusion

Wir orientierten unser praktisches Vorgehen zur Präparation und Perfusion der Mäuse an einem von NeuroScience Associates (NSA) veröffentlichten Protokoll [127]. Nach geringfügigen Modifikationen konnten wir die Perfusion mit hoher Erfolgsquote durchführen.

1. Zunächst wurde die narkotisierte Maus mit Kanülen auf einer Styroporplatte fixiert, das Fell tränkten wir mittels einer Spritzflasche mit 70% Isopropanol. Die Schnittführung erfolgte mittig vom unteren Abdomen bis zur Oberkante des Sternums. Das Peritoneum wurde dabei noch intakt gelassen. Zur besseren Darstellung des Präparationsgebietes wurde das Fell nach außen gezogen und ebenfalls mit Kanülen fixiert.
2. Wir eröffneten nun das Peritoneum durch einen Schnitt vom unteren Drittel des Abdomens bis zum Processus xiphoideus, dann seitwärts parallel zur letzten Rippe bis zur Laterallinie, um einen besseren Abfluss von Blut und Perfusionslösung zu gewährleisten und später den Thorax großräumig eröffnen zu können.
3. Das Diaphragma wurde entlang den Rippenbögen abgeschnitten.
4. Eröffnung des Brustkorbes lateral bis ca. 1. Rippe beidseits. Dabei wurde darauf geachtet, die nun bereits kollabierten Lungen nicht zu verletzen.

5. Die vordere Thoraxwand wurde nach kranial weggeklappt und mit einer weiteren Kanüle in Position gehalten.
6. Es wurden die Ligamenti zwischen Sternum und Thoraxorganen (Thymus und Herz) mit einer Sonde stumpf durchtrennt.
7. Mit einer feinen chirurgischen Pinzette wurde die Herzspitze gegriffen und das Herz festgehalten, um nun mit einem Skalpell den linken Ventrikel anstechen zu können.
8. Sofort wurde dann eine abgestumpfte Kanüle, die mit dem Perfusionssystem verbunden war, durch diese Inzision hindurchgeführt und bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Schon zu diesem Zeitpunkt lief die Perfusionspumpe mit einer Basisflussrate von 0,4ml/min. Um ein Herausrutschen der Kanüle zu verhindern wurde diese nun fixiert, indem eine Klemme so gesetzt wurde, dass sie das komplette Herz auf Kammerhöhe umfasste und an die Kanüle andrückte.
9. War dies geschehen, so wurde das rechte Herzhorn mit einer Schere eröffnet um den Abfluss des Bluts zu gewährleisten. Die Pumpengeschwindigkeit der Perfusionspumpe wurde dann auf 2ml/min erhöht.
10. Die Heparinlösung wurde für 5min bei dieser Flussrate injiziert; danach wurde auf Heparin-freies DPBS umgestellt und weitere 10min perfundiert. Die Füllung des Schlauchsystems dauerte bei dieser Flussrate etwa 5min, insofern wurde das Kreislaufsystem für 10min mit DPBS/Heparin und 5min mit DPBS gespült.
11. Nachdem nun das gesamte Blut ausgewaschen war, wurde das System auf die Bouin-Hollande-Lösung umgeschaltet. Die Flussrate von 2ml/min wurde beibehalten. Fortführung der Perfusion für weitere 10min.
12. Klemme und Kanüle wurden nach der Perfusion entfernt und die Präparation der Organe begonnen.

Hinweise auf eine gute Perfusion zeigten sich beim Auswaschen des Blutes bereits nach kurzer Zeit: Die Leber wurde deutlich blasser und die mesenterialen Gefäße entfärbten sich vollständig. Wurde schließlich auf Bouin-Hollande-Lösung umgestellt, färbte sich der Darm sehr rasch gelb, bevor die Lösung aus dem eröffneten rechten Herzohr austrat. Im Laufe der Perfusion wurde die Läppchenstruktur der Leber erkennbar. Zuletzt waren auch Schnauze, Pfoten und Schwanz deutlich gelb; s. Abb. 10.

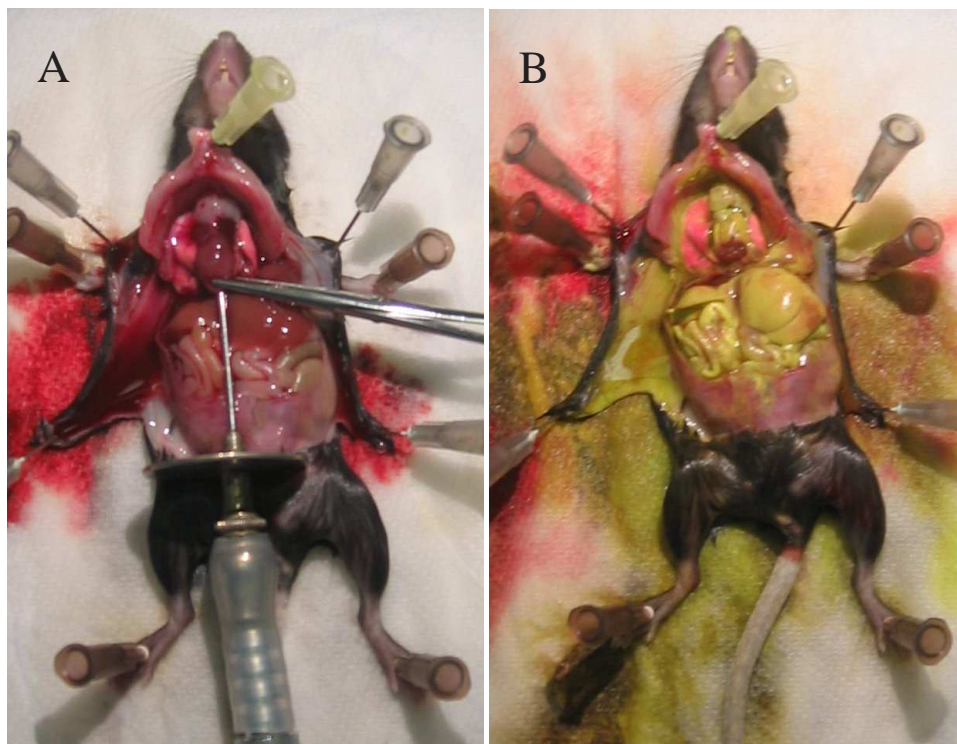


Abbildung 10: Maus mit eröffnetem Thorax und in die Aorta eingeführte Kanüle zu Beginn der Perfusion (A). Nach abgeschlossener Perfusion sind Schnauze, Darm, Leber und Pfoten deutlich gelb gefärbt (B).

4.5.4 Organpräparation

Unsere Versuchsplanung beinhaltete lediglich die Untersuchung der Gehirne. Dennoch wurden weitere Gewebe wie Lymphknoten und Rückenmark asserviert. Im Folgenden wird das praktische Vorgehen bei der Gewebeentnahme beschrieben.

- **Zervikale Lymphknoten:** Der längs verlaufende Einschnitt im Fell der noch auf dem Rücken liegenden Maus wurden weitergeführt, so dass das frontale Halspaket einsehbar wurde. Mit sehr feinen Pinzetten (Aesculap No. 7) wurden die zervikalen Lymphknoten unter Lupensicht (Eschenbach Lupenbrille) präpariert.
- **Gehirn:** Mit einer kräftigen Schere wurde die Dekapitation durchgeführt. Vom Nacken wurde das Fell über die Kalotte hinweg in Richtung Schnauze eingeschnitten und nach vorne gezogen. Im Bereich der oberen Halswirbelsäule und des Okzipitalpols wurden die Knochen mit einer spitzen, gebogenen Schere vorsichtig eingeschnitten, der restliche knöcherne Schädel wurde stumpf mit einem kleinen Spatel abpräpariert. Nach der Entnahme des Gehirns mit anhängendem Zerebellum und Hirnstamm erfolgte die Präparation der Bulbi olfactorii und der Trigeminalganglien, welche separat aufbewahrt wurden.
- **Wirbelsäule:** In vorherigen Versuchen, Spinalganglien direkt zu präparieren, erwiesen sich dieses Vorgehen als nicht praktikabel. Daher entschieden wir uns dafür, die kompletten Wirbelsäulen der Mäuse zu präparieren, um sie später zu entkalken und so immunhistochemische Färbungen der Spinalganglien anfertigen zu können. Rechts und links wurden dazu die Rippen durchtrennt und die Wirbelsäule knapp über dem Becken abgesetzt.

Die entnommenen Gewebe wurden in mit Bouin-Hollande-(B/H)-Lösung gefüllte Falcon-Röhrchen (Gehirne und Wirbelsäulen) bzw. Eppendorf-Reaktionsgefäße (kleine Gewebeproben) gegeben.

4.5.5 Einbetten der Gewebe

Die Gewebe in B/H-Lösung wurden für 24 Std. auf einem Schüttler gestellt, anschließend die B/H-Lösung durch 70%igen Ethanol ersetzt; die Fixationslösung sollte nun aus den Geweben ausgewaschen werden. Der Alkohol wurde im 24-Stundenintervall in den Röhrchen (bzw. Eppendorf-Cups) gewechselt, bis er sich

nach dem Wechseln nur noch schwach gelb färbte. Danach wurden die Gewebe in Einbettkassetten und diese wiederum in frischen 70%igen Ethanol gegeben. Darin verblieben sie für weitere 24 Stunden. Anschließend wurden sie einzeln in Einbettkassetten eingeschlossen und diese in einen Einbettautomaten gegeben, der die Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin überführte:

Lösung	Zeit	Temperatur
Ethanol 70%	1 Stunde	40°C
Ethanol 80%	1 Stunde	40°C
Ethanol 90%	1 Stunde	40°C
Ethanol 96%	1 Stunde	40°C
Ethanol 100%	3 × 1 Stunde	40°C
Xylol	3 × 1 Stunde	40°C
Paraffin	4 × 1 Stunde	60°C

Tabelle 6: Programmlauf: Paraffinisierung

4.6 Histologische Färbungen

4.6.1 Vorbereitung der Objektträger

Um eine gute Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden die Objektträger (Menzel GmbH + Co KG) vor deren Verwendung silanisiert.

1. Zuerst wurden die Objektträger zu jeweils 25 Stück in Kunststoffhalterungen eingeräumt, davon jeweils 8 in eine Kunststoffwanne gestellt.
2. Die Objektträger wurden mit 60°C heißem Wasser (ca. 1,7l) aus dem Wasserhahn und Spülmittel in der haushaltsüblichen Menge auf einem automatischen Schüttler für eine Stunde gespült. Anschließend wurde dreimal mit heißem Wasser aus dem Wasserhahn gewaschen, um das Spülmittel zu entfernen. Nun wurde jeweils noch einmal mit demineralisiertem Wasser und

dann mit Reinstwasser (Aqua bidest) nachgewaschen. Abschließend erfolgte eine 45 minütige Waschung mit 70%igem Ethanol.

3. Trocknung der Objektträger über Nacht bei 60°C in einem Trockenschrank.
4. Es folgte die Beschichtung der Objektträger mit TESAP (3-(Triethoxysilyl)propylamin). Dazu wurden drei Schalen mit jeweils 200ml Aceton bereitgestellt. In die erste Schale wurden zusätzlich 4ml TESAP gegeben, dies entspricht einer 2%igen Lösung. Die Halterungen mitsamt den Objektträgern wurden für 30 Sekunden in die TESAP/Aceton-Lösung gestellt, anschließend jeweils 30 Sekunden in die anderen beiden Schalen mit Aceton. Dann wurden sie kurz in demineralisiertem Wasser und dann in Aqua bidest gewaschen.
5. Trocknen der Objektträger bei 42°C über Nacht im Trockenschrank.

4.6.2 Giemsa-Färbung

Um vergleichbare Resultate zu erzielen, wurden die Hirnschnitte im jeweils gleichen Hirnabschnitt vorgenommen, im Bereich zwischen Bregma -2,7mm und Bregma -2,9mm (vgl. Abschnitt 4.7). Um diese Bestimmung vornehmen zu können, sowie zur weiteren histologischen Untersuchung, wurde nach jedem fünfzehnten Schnitt ein gesonderter Objektträger mit einem Hirnschnitt belegt, der nach Giemsa gefärbt wurde (s. Tabelle 7). Alle Gewebeschnitte wurden auf einem Mikrotom mit einer Schnittdicke von 7µm angefertigt.

Die Giemsa-Stammlösung wurde 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Um ein Ausfällen der Farbstoffe zu vermeiden, wurde erst Aqua bidest in die Küvette und dann vorsichtig die filtrierte Stammlösung hinzu gegeben. Die Giemsa-Lösung enthält als dreifach-Farbstoffkombination Azur-Eosin-Methylenblau.

Lösung	Zeit
Xylol	2 x 5min
abs. Alkohol	2 x 5min
96% iger Alkohol	5min
90% iger Alkohol	5min
80% iger Alkohol	5min
70% iger Alkohol	5min
Aqua dest	5min
Giemsa-Lösung frisch zubereitet	1Std
CH ₃ COOH-Wasser	Differenzieren der Rottöne
96% iger Alkohol	Differenzieren der Blautöne
abs. Alkohol	3 x 5min
Xylol	3 x 5min

Tabelle 7: Färbeprotokoll zur Durchführung einer histologischen Färbung nach Giemsa.

4.6.3 Immunhistochemie (IHC, Einfachmarkierung DAB / Nickel)

Im Folgenden wird die Durchführung einer einfachen immunhistochemischen Färbung mit DAB / Nickel beschrieben.

1. Entparaffinierung der der Schnitte: Dreimal in Xylol, dann einmal in absolutem Isopropanol für jeweils 10min.
2. Deaktivierung der endogenen Gewebe-Peroxidase durch eine 0,15%ige H_2O_2 -Lösung (3ml 30%iges H_2O_2 in 600ml Methanol), die lichtgeschützt für 30min einwirkte.
3. Rehydrierung in Isopropanol (abs. Isopropanol 10min, Isopropanol 96%-80%-70% jeweils 5min) und anschließend Aqua bidest für 2 x 5min.
4. Erhitzen für 12min in 0,01M Natriumzitat-Puffer (pH 6,0) bei 92°C bis 94°C. Der Natriumzitat-Puffer bestand aus 54ml 0,1M Zitronensäure und 246ml 0,1M Natriumzitat, aufgefüllt bis 3000ml mit Aqua bidest. Um das Anlagern von Luftblasen zu vermeiden, wurden die sich in 24-er Metallständern befindlichen Objektträger in regelmäßigen Abständen im Natriumzitat-Puffer geschwenkt. Das Erhitzen der Schnitte in Natriumzitat-Puffer diente dazu, den Nachweis von schwach exprimierten Proteinen zu verstärken. Proteine im Gewebe werden durch die angewendete Fixationsmethode miteinander vernetzt, so dass Antikörper-Bindungsstellen teilweise weniger gut zugänglich sind bzw. nicht detektiert werden. Das Erhitzen der Schnitte führte zu einer Denaturierung von Antigenen und sonstigen Proteinen. Dadurch Freilegung von Bindungsstellen konnten die Antikörper besser binden.
5. Trockensaugen der Objektträger und Umfahren der einzelnen Schnitte mit PAP-Pen. Der bearbeitete Objektträger wurde unverzüglich in eine Küvette mit PBS (50mM) + 5% BSA (Bovines Serum-Albumin) überführt und darin mindestens 30min bei Raumtemperatur belassen. Es folgt eine Inkubation in PBS (50mM) + 1% BSA, 5min bei RT.

6. Blocken der Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Komplex (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Inc.). Avidin und Biotin lagen in jeweils 30%iger Lösung vor (in PBS (50mM) + 1% BSA). Zuerst wurde die Avidin-Lösung auf die trocken gesaugten Schnitte aufgetropft, diese wurden dann 20min bei RT inkubiert, anschließend mit Aqua bidest abgespült und sofort wieder in PBS (50mM) + 1% BSA gegeben, um einerseits das Austrocknen zu verhindern und andererseits die Oberflächenspannung auf der Schnittoberfläche herabzusetzen. Mit der Inkubation mit Biotin-Lösung wurde anschließend genau wie mit der Avidin-Lösung verfahren; nach dem Abspülen wurden die Objektträger wieder in PBS (50mM) + 1% BSA gegeben. Die Avidin / Biotin Blockade diente der Verringerung der Hintergrundfärbung.
7. Betropfen der Schnitte mit den primären Antikörpern in der jeweiligen Arbeitsverdünnung (s. Abschnitt 3.8) und Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 16°C. Zur Verdünnung der Antikörper wurde PBS + 1%BSA verwendet.
8. Die eigentliche Inkubation erfolgte am darauf folgenden Tag für 2 Stunden durch automatisches Aufheizen des Inkubators auf 37°C.
9. Abspülen der Primärantikörper mit Aqua bidest und waschen in Aqua bidest (3 x 5min). Eine weitere Waschung mit PBS + 0,5% BSA schloss sich an.
10. Inkubation der Schnitte mit den Sekundär-Antikörpern (s. Abschnitt 3.8.2) für 45min bei RT.
11. Nach der Inkubation wurden die Antikörper mit Aqua bidest abgespült; es folgte abermals die dreimalige Waschung in Aqua bidest (jeweils 5min) sowie die einmalige Waschung in PBS + 0,5% BSA.
12. Inkubation mit Avidin DH und biotinylierten Enzymen (Vectastain Elite ABC Kit). Die Beiden Komponenten (Avidin DH und biotinmarkierte Enzyme) wurden mit einer Pufferlösung, bestehend aus PBS + 1% BSA verdünnt (jeweils 20 μ l pro 1ml Lösung). Die Lösung wurde für 30min bei RT vorinku-

biert, dann folgte die Inkubation der Schnitte für 30min, ebenfalls bei Raumtemperatur. Das anschließende Abspülen und Waschen in Aqua bidest und PBS erfolgte wie nach der Inkubation mit den Antikörpern.

13. Es folgte die DAB-Nickel-Färbung. Dazu wurden 12,5mg DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Sigma-Aldrich) und 75mg Ammonium-Nickel-Sulfat (Sigma-Aldrich) in 800ml PBS (50mM) gelöst, die Lösung anschließend filtriert. In der Lösung wurden die Schnitte 5min vorinkubiert, wobei ein Magnetrührer für eine gleichmäßige Exposition der Schnitte sorgte. Zum Starten der Färbereaktion wurden dann 112 μ l H_2O_2 zugegeben und die Schnitte weitere 8min in der Lösung belassen. Die Reaktion wurde mit Aqua bidest gestoppt (3 x 5min waschen). Ammonium-Nickel-Sulfat bewirkte eine Farbmodifikation der DAB-Färbung, was in einer dunkleren und damit stärkeren Färbung führte [72].
14. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Isopropanol: 70%, 80%, 96% jeweils 5min, dann 3 mal 100% Isopropanol für jeweils 10min); danach noch 3 mal in Xylol für jeweils 10min.
15. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte mit DePeX (Serve Electrophoresis GmbH). Die Gewebeschnitte waren damit versiegelt und nach dem Trocknen archivierbar.

4.6.4 IHC-Doppelmarkierung (DAB / Fluoreszenz)

Insbesondere bei der RV-G-Expression interessierte uns, wie viele der infizierten Zellen tatsächlich Glykoprotein exprimierten. Um die Expressionsrate von RNP und RV-G in denselben Zellen mittels immunhistochemischer Färbung bestimmen zu können, mussten diese doppelt markiert werden.

Durch die gegebenen technischen Eigenschaften an der Mikroskop-Einheit, an der die Quantifizierung mittels MCID-Software durchgeführt werden sollte, musste eine Doppelmarkierung mit DAB und einfacher Fluoreszenzmarkierung (Alexa

Fluor A488) entwickelt werden. Durch mehreren Versuche erzielten wir gut quantifizierbare Ergebnisse, indem zuerst RNP mit DAB und anschließend RV-G mit Fluoreszenzmarkiertem Streptavidin markiert wurde.

Wir entwickelten ein sequenzielles Färbeprotokoll, bei dem zwei komplette immunhistochemische Färbedurchläufe hintereinander geschaltet wurden. Dazu wurde im ersten Abschnitt entsprechend dem Protokoll der einfachen immunhistochemischen Färbung für RNP bis zum eigentlichen Färbeschritt mit DAB / Nickel vorgegangen; jedoch wurde bei der Doppelmarkierung nur DAB in 800ml PBS ohne Ammonium-Nickel-Sulfat verwendet. In anfänglichen Versuchen hatte sich nämlich gezeigt, dass eine Färbung mit DAB / Nickel eine nachgeschaltete Fluoreszenzfärbung überlagerte.

Nach dem DAB-Färbeschritt wurden die Schnitte in Aqua bidest gespült, jedoch nicht dehydriert. An diesem Punkt begann die immunhistochemische Fluoreszenz-Gegenfärbung für RV-G:

1. Überführung der Schnitte in 5% BSA; Inkubation bei RT für 30min. Anschließend Inkubation in 1% BSA für 5min bei RT.
2. Avidin-Blockade für 20min bei RT; Spülung mit Aqua bidest, Inkubation in 1% BSA für 5min bei RT.
3. Biotin-Blockade für 20min bei RT; Spülung mit Aqua bidest, Inkubation in 1% BSA für 5min bei RT.
4. Betropfen der Schnitte mit den gegen RV-G gerichteten Antikörpern in der Verdünnung 1:3000.
5. Inkubation über Nacht bei 16°C. Am folgenden Tag bei 37°C für 2 Std.
6. Abspülen der Primärantikörper mit Aqua bidest und waschen der Schnitte in Aqua bidest (3 x 5min). Eine weitere Inkubation in 0,5% BSA schloss sich an.
7. Inkubation der Schnitte mit Sekundär-Antikörpern (anti-Kaninchen IgG, biotinyliert) für 45min bei 37°C.

8. Nach der Inkubation wurden die Antikörper mit Aqua bidest abgespült; es folgte abermals die dreimalige Waschung in Aqua bidest (jeweils 5min) sowie die Inkubation in 0,5% BSA.
9. Inkubation mit Fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Alexafluor A488, Mo-BiTec) in der Verdünnung 1:100 für 2 Stunden bei 37°C.
10. es folgte ein abschließender Waschgang (3 x Aqua bidest für 5min, anschließend PBS für 10min)
11. Eindeckeln mit Fluor-Safe (DakoCytomation, Inc.), danach lichtgeschützte Lagerung bei +4°C.

Es stellte sich heraus, dass der Überlagerungseffekt mit dem neu entwickelten Färbeprotokoll derart reduziert wurde, dass er die nachfolgende Quantifizierung nicht mehr beeinflusste (s. Abb. 11). Diese erfolgte, indem die gefärbten Zellen bei 400-facher Vergrößerung mittels SPOT-Kamera aufgenommen und die gefärbte Fläche pro Zelle relativ zur zellulären Gesamtfläche mittels MCID-Software quantifiziert wurde (s. Abschnitt 4.7).

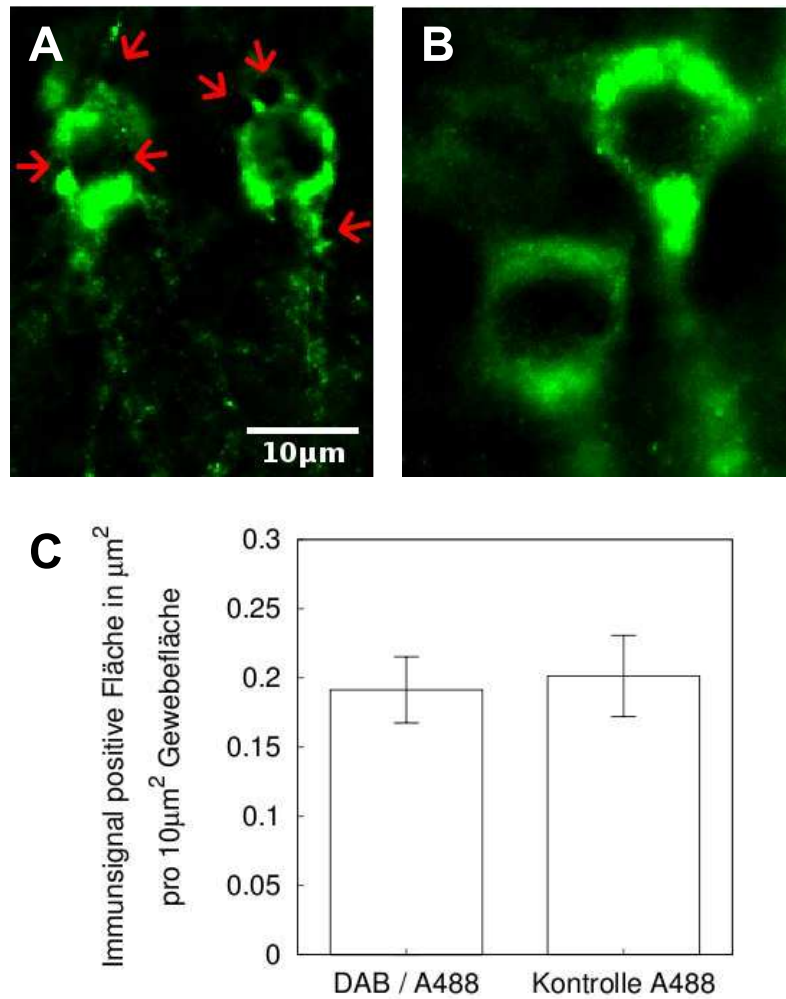


Abbildung 11: Überprüfung des Überlagerungseffektes. in der Doppelmarkierung (A) ist RNP (DAB, schwarz mit roten Pfeilen markiert) gegen RV-G (grün, A488) gefärbt. Bei der Einzelmarkierung (B) wurde lediglich RV-G mittels Immunfluoreszenzfarbstoff (grün, A488) markiert. Aufnahmen bei 600-facher Vergrößerung. Bei der Quantifizierung der Kontrollfärbungen war kein signifikanter Unterschied zwischen Einfach- und Doppelmarkierung in Bezug auf das mit Alexafluor-A488 markierte RV-G nachweisbar (C). Vertikale Balken kennzeichnen die jeweilige Varianz. Eine Überlagerung der Färbungen fand somit nur in zu vernachlässigendem Umfang statt und die Methode erwies sich deshalb als brauchbar für weitere Quantifizierungen.

Um bei der eigentlichen Messung exakt dieselben Bereiche des jeweiligen Gewebeschnittes zu erfassen, wurden zuerst die zu quantifizierenden Bereiche mittels SPOT-Software bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Dazu wurde zuerst ein Bild der Fluoreszenzfärbung (entspricht RV-G) und dann, ohne den Aus-

schnitt zu verschieben, derselbe Ausschnitt im Hellfeld-Modus zur Aufnahme der DAB-Färbung (entspricht RNP) fotografiert. Beide Bilder wurden gespeichert und in MCID in zwei Kanälen geöffnet. Durch Verknüpfung dieser beiden Kanäle ermöglichte MCID eine synchrone Quantifizierung derselben Bildbereiche (s. Abb. 12).

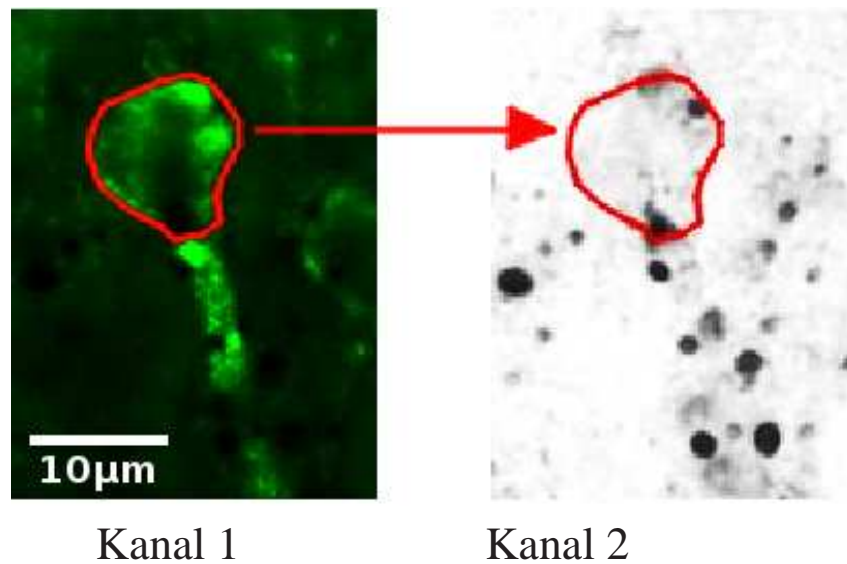


Abbildung 12: Synchronisierte Quantifizierung der RV-G-Markierung (links) sowie der RNP-Markierung (rechts) durch Nutzung zwei verknüpfter Kanäle mittels MCID (s. Abschnitt 4.7).

4.6.5 Immunhistochemische Doppelfluoreszenzmarkierung

Wir führten Doppelfluoreszenzmarkierungen durch, um zu untersuchen, ob Autophagie spezifisch in von Rabies-Viren befallenen Neuronen stattfindet. Dazu wurden die Antikörper LC3B (Autophagosomenmarker) Rabies NMAS (Antikörper gegen RNP) gefärbt. Das Färbeprotokoll entsprach weitgehend dem der Doppelfluoreszenzmarkierung DAB/Fluoreszenz, allerdings wurde auf die Inkubation mit Methanol / H_2O_2 , welche der Blockade endogener Peroxidasen diente, verzichtet. Die Gewebe wurden simultan mit beiden Primärantikörpern inkubiert – dies war aufgrund unterschiedlicher Donorspezies der Primärantikörper möglich. Nach der Inkubation über Nacht bei 16°C wurde die Färbung folgendermaßen fortgesetzt:

1. Inkubation bei 37°C für 2 Std.
2. Abspülen der Primärantikörper mit Aqua bidest waschen in Aqua bidest (3 x 5min). Danach Inkubation in 0,5% BSA für 5min.
3. Inkubation der Schnitte mit Sekundär-Antikörpern (anti-Kaninchen IgG, biotinyliert) für 45min bei 37°C.
4. Nach der Inkubation wurden die Antikörper mit Aqua bidest abgespült; es folgte abermals die dreimalige Waschung in Aqua bidest (jeweils 5min) sowie die Inkubation in 0,5% BSA.
5. Simultane Inkubation mit Fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Alexafluor A488, Verd. 1:200) + Sekundärantikörper Huhn-anti-Maus IgG (Alexa Fluor 647-gekoppelt, Verd. 1:200) für 2 Stunden bei 37°C.
6. es folgte ein abschließender Waschgang (3 x Aqua bidest für 5min, anschließend PBS für 10min).
7. Eindeckeln mit Fluor-Safe (DakoCytomation, Inc.), lichtgeschützte Lagerung bei +4°C.

Damit wurde nun LC3B mit Alexa Fluor 488, Rabies NMAS mit Alexa Fluor 647 markiert. Zur Sichtbarmachung der Färbung wurde das Laser Scanner Mikroskop BX50WI von Olympus eingesetzt.

4.6.6 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Während der Apoptose wird die DNA des Zellkerns von Endonukleasen fragmentiert; dabei werden an den Fragmentationsstellen Hydroxylgruppen frei. Bei der TUNEL-Färbung werden diese freien Hydroxylgruppen durch das Enzym TdT mit markierten Nukleotiden versehen – in diesem Falle handelt es sich dabei um Fluorescein-dUTP. Im Fluoreszenzmikroskop (Olympus Provis AX70) konnten die markierten Areale visualisiert werden. Verwendet wurde das *in situ* Cell Death Detection Kit von Roche Diagnostics GmbH.

Durchführung der TUNEL-Färbung

1. Wie bei den vorherigen Gewebefärbungen wurde zuerst das Paraffin mittels Xylol aus den Gewebeschnitten gelöst, danach durch eine Isopropanol-Reihe absteigender Konzentration (100%, 96%, 80%, 70%) das Gewebe in die wässrige Phase überführt.
2. Waschen in ddH_2O 2×5 min, danach in PBS (50mM) für 10min.
3. Inkubation mit Proteinase K (20 μ g/ml) in 10mM Tris-HCL (pH 7,4) für 25min bei 37°C (Küvette, mit Parafilm abgedeckt).
4. Waschen in PBS (50mM) 2×5 min.
5. Deaktivierung der endogene Peroxidase des Gewebes durch eine 0,15%ige H_2O_2 -Lösung (3ml 30%iges H_2O_2 in 600ml Methanol). Einwirkzeit: 30min, lichtgeschützt.
6. Waschen in PBS (50mM) 1×5 min.

7. Inkubation in einer Lösung aus jeweils 0,1%igem tri-Natriumzitat-Dihydrat und Triton für 2min bei 4°C (eisgekühlte Küvette) zur Permeabilisierung des Gewebes.
8. Waschen in PBS (50mM) $1 \times 5\text{min}$.
9. Trockensaugen der Objektträger und Umrandung der Gewebeschnitte mit PAP-Pen.
10. Auftropfen des TUNEL-Reagenz (1 Teil Enzyme Solution + 9 Teile Label Solution). Inkubation für 60min bei 37°C in einer feuchten Kammer.
11. Waschen in PBS (50mM) $3 \times 5\text{min}$.
12. Anschließend erfolgte optional eine Fluoreszenz-Gegenfärbung. Deren genauere Durchführung ist in Abschnitt 4.6.4 beschrieben. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluoreszenzmarkiertes Streptavidin Alexafluor A647 verwendet.

4.7 MCID

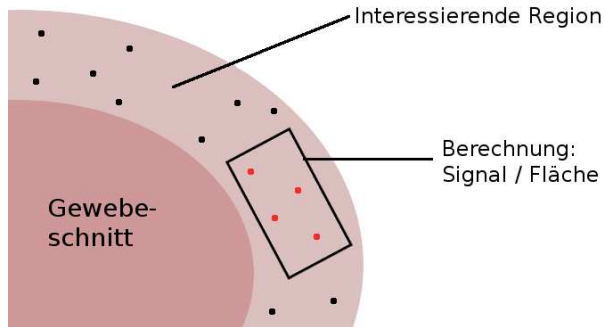


Abbildung 13: Funktionsweise der MCID-Quantifizierung. Die interessierende Region wurde nach und nach abgerastert und die anhand von zuvor festgelegten Schwellenwerten bestimmte Signal-positive Fläche in Relation zur gemessenen Gesamtfläche gesetzt.

Programme übertragen. Anhand zuvor festgelegter Schwellenwerte wurden dann die immunhistochemisch gefärbten Bereiche als „Signal“ gewertet und in Relation zur gemessenen Fläche gesetzt. Die Schnitte wurden manuell durchgerastert. In der späteren Datenauswertung wurden dann die Flächen mit „Signal“ in Relation zur gemessenen Gesamtfläche gesetzt (s. Abb. 13).

Die zuverlässigsten und homogensten Färbungen erzielten wir im Bereich des Hippocampus. Wir wählten daher das Pes hippocampi (Ammonshorn, Bereiche CA1 bis Beginn CA2) als interessierende Region und vermaßen ihn unter Ausschluss des Gyrus dentatus (s. Abb. 15). Um die jeweils gleiche Position zu vermessen, beschränkten wir uns auf die Bregma-Ebenen im Bereich von -1,58mm bis -2,06mm (s. Abb. 14).

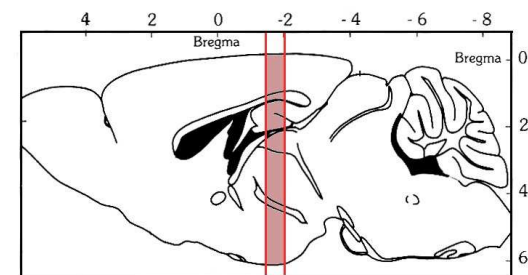


Abbildung 14: Einteilung des Maus-Gehirns in Bregma-Ebenen; Sagittalanzeige. Rötlich eingefärbt: der Bereich, aus dem die Schnitte stammten, welche zur Messung herangezogen wurden. Modifizierte Darstellung aus [133].

Die Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte erfolgte mittels MCID-Software (InterFocus Imaging Ltd). Dazu wurde zuerst der interessierende Bereich des Gewebes im Hellfeldmikroskop (Olympus Provis AX70) eingestellt und das Bild mittels einer digitalen Kamera (SPOT RT Slider) erfasst und an das MCID-

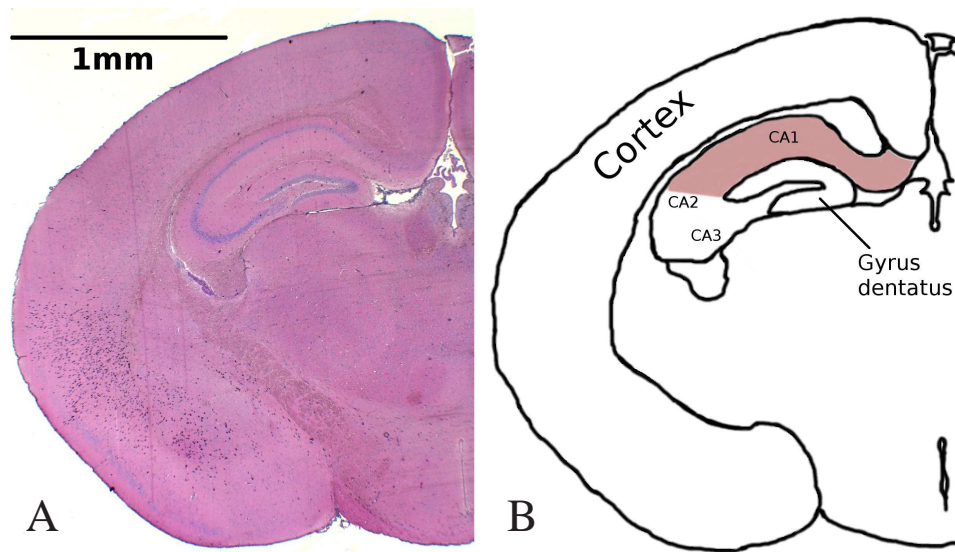


Abbildung 15: A: Giemsa-Färbung eines Frontalschnittes durch ein Maus-Gehirn in der Bregma-Ebene -1,58mm (20-fache Vergrößerung). B: Vereinfachte Darstellung der anatomischen Strukturen (orientiert an [133]). Die MCID-Quantifizierungen erfolgten im rot angefärbten Bereich des Hippocampus. CA1 bis CA3 bezeichnen die entsprechenden Bereiche des Pes hippocampi.

4.8 qRT-PCR

Wir führten zur RNA-Quantifizierung eine quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) durch. Nachzuweisende Zielsequenzen werden bei der PCR exponentiell amplifiziert. Die real-time PCR hat gegenüber der konventionellen PCR den Vorteil, dass Zielsequenzen quantitativ nachgewiesen werden können. Im Gegensatz zu Verfahren wie Taqman[®] wird bei SYBRgreen jegliche amplifizierte doppelsträngige Nukleinsäure registriert. Es muss daher sehr auf Sauberkeit am Arbeitsplatz geachtet werden, um Kontaminationen zu vermeiden – dazu zählt die Verwendung von Mundschutz und Einmal-Handschuhen sowie der Einsatz steriler, gestopfter Pipetten.

Generell können durch den Nachweis bestimmter RNA-Sequenzen Rückschlüsse auf die Genexpressionsaktivität zugehöriger Gene gezogen werden. Abb. 16 fasst die einzelnen Arbeitsschritte bei der Durchführung der qRT-PCR zusammen, wel-

che im folgenden ausführlicher beschrieben werden.

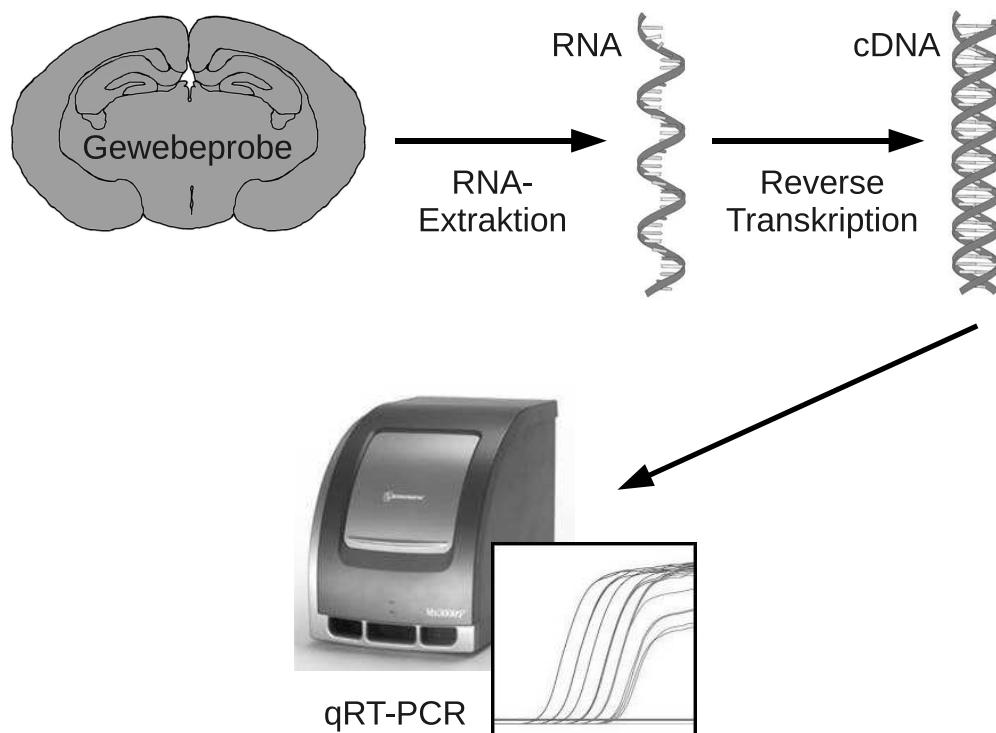


Abbildung 16: Schematische Darstellung der im Folgenden eingehender beschriebenen Arbeitsschritte zur RNA-Quantifizierung.

4.8.1 Gewinnung von Gewebeproben

Zur Gewinnung von RNA verwendeten wir frisch gewonnenes Gewebe. Dazu wurden die Mäuse in eine Kammer gesetzt, in die wir CO₂-Gas einleiteten. Den toten Mäusen entnahmen wir dann Gehirn, zervikale Lymphknoten, Trigeminalganglien und die Bulbi olfactorii. Für die Präparation der einzelnen Mäuse wurden jeweils die Unterlage und die Handschuhe gewechselt sowie frisches, autoklaviertes Instrumentarium verwendet. Die Gehirne wurden zerteilt und alle Gewebe wurden unverzüglich nach der Entnahme in RNAlater (Qiagen Sciences) gegeben (8ml pro Gehirn, jeweils 1ml für jede andere Probe) und die Proben bei +4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.8.2 Homogenisierung der Proben

Für die PCR-Analysen wurde jeweils der frontale Abschnitt der Gehirne (bis Bregma-Ebene -2mm) verwendet. Die Gewebe wurden dazu aus dem RNAlater herausgenommen, gewogen und mit 1ml β -ME-RLT (Beta-mercaptoethanol, Bestandteil des Qiagen RNeasy® Mini Kit) pro 100mg Gewebe in frische Gefäße gegeben, was der Denaturierung endogener RNasen diente. Dann erfolgte die Homogenisierung mittels einem Gewebe-Homogenisierer (Omni) und jeweils frischen, autoklavierten Aufsätzen (Hard Tissue Omni Tip) für 40 Sekunden. Nun wurde je 1ml des Lysates in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und ein zweites Aliquot bei -80°C aufbewahrt. Das Lysat wurde nun noch einmal homogenisiert, indem es zehn mal in eine Spritze aufgezogen und durch eine 20-gauge-Nadel gepresst wurde. Danach wurde das Lysat für 3min bei höchster Geschwindigkeit (13.000U/min, entspricht beim verwendeten Rotor einer RZB von $16.249 \times g$) zentrifugiert und 600 μ l des Überstandes in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert.

4.8.3 RNA-Extraktion

Die RNA-Aufreinigung wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen durchgeführt. Zur DNA-Fraktionierung wurde das „RNase-Free DNase Set“ desselben Herstellers eingesetzt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die homogenisierten Proben (je $600\mu\text{l}$) wurden mit jeweils $600\mu\text{l}$ 70%igem RNase freiem Ethanol gemischt. Nun wurden $600\mu\text{l}$ in eine Quiagen-Spincartridge gegeben und diese dann bei $13.000\text{U}/\text{min}$ für 15sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zentrifugation mit den verbleibenden $600\mu\text{l}$ Probe wiederholt. Anschließend wurde je $350\mu\text{l}$ Buffer RW1 in die Säule der Spincartridge (s. Abb. 17) gegeben, wiederum bei

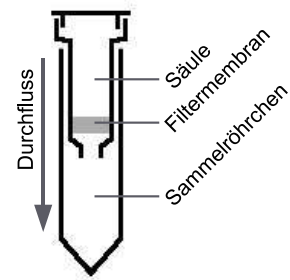


Abbildung 17: Eine Spincartridge.

$13.000\text{U}/\text{min}$ für 15sek zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum DNA-Verdau wurden nun $80\mu\text{l}$ DNase I Inkubationsmix (bestehend aus $10\mu\text{l}$ DNase I Stammlösung und $70\mu\text{l}$ Buffer RDD) auf die Filtermembran pipettiert und diese 15min bei RT inkubiert. Dann wurden $350\mu\text{l}$ Buffer RW1 in die Säule pipettiert und 15sek bei $13.000\text{U}/\text{min}$ zentrifugiert. Anschließend wurde das Sammelröhrchen durch ein Frisches ersetzt und $500\mu\text{l}$ Buffer RPE in die Säule pipettiert. Zentrifugation bei $13.000\text{U}/\text{min}$ für 3min, um die Filtermembran vollständig zu trocknen. Die Säule wurde aus dem Sammelröhrchen genommen und in ein Frisches verbracht. Um die in der Filtermembran gebundene RNA zu lösen, wurden nun je $40\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser in die Mitte der Filtermembran pipettiert und diese damit für 10min inkubiert. Anschließend wurde noch einmal für 1min bei $13.000\text{U}/\text{min}$ zentrifugiert, um die gelöste RNA im Röhrchen zu sammeln. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -20°C .

4.8.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für vergleichbare Resultate mussten die Konzentrationen der RNA-Proben bekannt sein. Dazu wurde zuerst für jede Probe eine 1:50-Verdünnung hergestellt ($2\mu\text{l}$ RNA-Lösung + $98\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser). Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm (A_{260}) in einer 1ml-Küvette wurde dann mittels eines UV-Photospektrometers (Shimadzu UV-1610) bestimmt. Aus der jeweiligen Absorptionsrate ließ sich dann die RNA-Konzentration wie folgt berechnen:

$$\begin{aligned}\text{Konz. der RNA-Probe } [\mu\text{g}\mu\text{l}] &= \frac{40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \\ &= \frac{40 \times A_{260} \times 50}{1000}\end{aligned}$$

4.8.5 Reverse Transkription genomischer RNA

Zur reversen Transkription genomischer RNA (RV-Nukleokapsid) verwendeten wir das Omniscript RT Kit von Qiagen. Verwendung fand folgendes Oligonukleotid (Sigma Genosys): 5'-ACA CCC CTA CAA TGG ATG C-3'.

Der Master-Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

Lösung	Menge (für eine Probe)
10× RT Puffer	2 μl
dNTP Mix (5mM von jedem dNTP)	2 μl
RNAse Inhibitor (40 Einheiten/ μl)	0,25 μl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 μl
RNAse-freies Wasser	4,75 μl
Gesamtmenge:	10 μl

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden jeweils 10 μl Master-Mix vorgelegt. Hinzu pipettiert wurden dann 2 μl Oligonukleotid-Mix (5 μM) und 8 μl RNA, welches durch Verdünnung jeweils 1 μg RNA enthielt. Der Programmlauf des Thermocyclers (PerkinElmer GeneAmp PCR System 2400) war folgendermaßen aufgebaut: 60min Inkubation bei 37°C, dann Erhitzung auf 95°C für 5min zur RNA-Hydrolysierung und Inaktivierung der Reversen Transkriptase und anschließend Abkühlung auf 4°C; Lagerung der cDNA-Template bei -20°C.

4.8.6 Reverse Transkription nicht-genomischer RNA

Abweichend zur reversen Transkription genomischer RNA verwendeten wir zur Herstellung von cDNA von nicht-genomischer RNA (IL-6, IL-10, IFN- β , IFN- γ) das RT² First Strand Kit von SuperArray.

Im ersten Schritt wurde die RNA von DNA-Spuren befreit, die zu Messfehlern bei der real-time PCR führen würden:

Lösung	Menge (für eine Probe)
RNA-Lösung	$x\mu l$ (RNA-Menge: $1\mu g$)
5 \times gDNA Elimination Buffer	$2\mu l$
RNase-freies Wasser	$10-x\mu l$
Gesamtmenge:	$12\mu l$

Die Proben wurden im Thermocycler für 5min bei 42°C inkubiert und anschließend gekühlt.

Im zweiten Schritt wurde mit den im Kit vorhandenen Komponenten ein Master-Mix, der u.a. poly-A Oligonukleotidprimer enthielt, hergestellt:

Lösung	Menge (für eine Probe)
5 \times RT-Buffer 3	$4\mu l$
Oligonukleotide und externer Kontroll-Mix	$1\mu l$
RT Enzym-Mix 3	$2\mu l$
RNase-freies Wasser	$3\mu l$
Gesamtmenge:	$10\mu l$

Zu jeder nun DNA-freien RNA-Probe wurden dann $10\mu l$ Master-Mix pipettiert (Gesamtvolumen je Probe $20\mu l$) und die Proben wiederum für 15min bei 42°C inkubiert

und danach für 5min auf 95°C erhitzt um die nun nicht mehr benötigte RNA zu hydrolysieren und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Bis zur Durchführung der real-time PCR wurden die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

4.8.7 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Verwendet wurde ein Thermocycler von Roche Applied Science (ABI Prism® 7000 Sequence Detection System). Für Angaben zu den verwendeten Oligonukleotiden s. Abschnitt 3.2.

Für die quantitative real-time PCR wurde das SYBR Green-Kit von SuperArray verwendet. Dazu wurden die Reaktionsgefäße (Thermo-Strips, Thermo Fisher Scientific Inc.) folgendermaßen befüllt:

Lösung	Menge (für eine Probe)
RT ² SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2X solution)	12,5µl
ddH ₂ O	10,5µl
cDNA-Templat	1µl
Oligonukleotid-Mix	1µl
Gesamtmenge:	25µl

Der Programmlauf war folgendermaßen: Nach initialer Erhitzung auf 95°C für 15min (Hotstart-Prozedur) folgten 40 Amplifikationszyklen:

Temperatur	Zeit
95°C	15sek
60°C	60sek
40°C	30sek

4.8.8 Auswertung der quantitativen real-time PCR

Die Auswertung der real-time PCR-Daten geschah im Falle des genomischen RV Nukleokapsid-Gens mit Hilfe einer Standardkurve. Diese lag aus vorhergegangenen Versuchen bereits vor und ermöglichte uns eine absolute Quantifizierung. Sie wurde nach folgendem Schema berechnet: Ein Realtime-PCR-Lauf mit RNA-Proben, deren Verdünnung sich in

aufsteigender Reihe jeweils um eine Log-Stufe unterschied, wurde gestartet. Anschließend wurde die Standardkurve konstruiert, indem der dekadische Logarithmus der Anzahl der ursprünglichen RNA-Kopien (ICN: initial copy numbers) gegen den jeweiligen Ct-Wert (Threshold Cycle) aufgetragen wurde. Der Ct-Wert bezeichnet den Anfang der Phase des exponentiellen Wachstums der Amplifikationskurve. Durch die aus diesen Werten interpolierte Geradengleichung der Standardkurve $x=(Ct-b)/m$ konnte nun für jede unbekannte Probe der dekadische Logarithmus der initialen Kopienzahl $\log(ICN)$ bestimmt werden (s. Abb. 18).

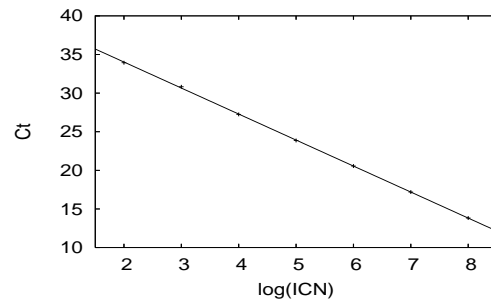


Abbildung 18: Standardkurve, hier beispielhaft für RV N-RNA. Ct: Threshold Cycle; ICN: initial copy numbers

Die Quantifizierung der Zytokin-mRNA hingegen erfolgte relativ zu den nicht-infizierten Kontrolltieren, wobei die ubiquitär vorhandene ribosomale 18s RNA als Referenz herangezogen wurde. Die Quantifizierung erfolgte mittels der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Dazu berechnete sich $\Delta\Delta Ct$ als Differenz zweier ΔCt -Werte:

$$\Delta Ct = Ct_{Gen\ X} - Ct_{Gen\ Ref}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Virus} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

Das Referenzgen (Gen Ref) war in diesem Falle 18s rRNA. Als Ausdruck der n-fachen Expression von Gen X eines Tieres in der Virus-Gruppe gegenüber jener

Expression in der Kontrollgruppe wurde der Expressionsfaktor EF folgendermaßen berechnet:

$$EF = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Als Basis dieses Terms wurde 2 eingesetzt, weil bei einer Effizienz der Amplifikation von 100% bei jedem Zyklus eine Verdopplung des Templates stattfindet.

4.9 Signifikanzprüfung

Die Durchführung der Signifikanzprüfung wird hier am Beispiel der VNA-Titer sowie der Ergebnisse der quantitativen Realtime-PCR bezüglich der RV-Nukleokapsid-RNA dargestellt.

4.9.1 VNA-Titer

Um zu überprüfen, ob der Unterschied in der VNA-Produktion von SPBN- und SPBN-DOG4-infizierten Tieren signifikant ist, wendeten wir den Student'schen t-Test für unabhängige Stichproben an. Wir überprüften die Nullhypothese H_0 : Der VNA-Titer der mit SPBN-DOG4-infizierten Tiere ist größer als der jener der Tiere, welche mit SPBN infiziert wurden ($\mu > \mu_0$). Durch Anwendung der Formel

$$t = \sqrt{n} \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma} = \sqrt{n} \frac{\bar{d}}{\sigma}$$

erhielten wir als Prüfgröße $t = 2,18$ ($n = 14$, weil pro Gruppe 14 Zellkolonien bewertet wurden; Arithmetisches Mittel $\bar{d} = 0,91$; Stichproben-Standardabweichung $\sigma = 1,56$). Aus der t-Tabelle ($t_{(q)}$ -Verteilung) geht hervor, dass $t(0,95;13) = 2,16$ ($t(n-\alpha;n-1)$). Weil $t > t(0,95;13)$ kann H_0 bei einem Signifikanzniveau von $\alpha \leq 5\%$ nicht abgelehnt werden – der VNA-Titer der mit SPBN-DOG4 infizierten Tiere ist also signifikant höher als der mit SPBN-DOG4 infizierten Tiere.

4.9.2 Quantitative Realtime-PCR

Nach gleichem Schema wurde bei der Signifikanzprüfung der mittels quantitativer real-time PCR quantifizierter RV-Nukleokapsid-RNA vorgegangen. Wir überprüften die Nullhypothese H_0 : „Der Unterschied in der Virus-Last der beiden Gruppen ist nicht signifikant“ sowie die Alternativhypothese H_1 : „Die Virus-Last der mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Tiere ist unterschiedlich“. Wir berechneten den t-Wert für zwei unabhängige Stichproben mit $t = 3,64$. Aus der Student'schen Tabelle konnte nun wiederum der t-Wert für $t(1 - \frac{\alpha}{2}; n + m - 2)$ entnommen werden: $t(0,975; 4) = 2,78$. Weil $|t| > t(0,975; 4)$ ist, verwarfen wir die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese bei einem Signifikanzniveau von $\alpha \leq 5\%$. Der Unterschied der VNA-Titer der mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Tiere ist also signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$).

4.9.3 Weitere Signifikanzprüfungen

Entsprechend den dargestellten Beispielen wurde auch mit der Signifikanzprüfung der übrigen PCR-Ergebnisse sowie der Ergebnisse der optischen Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen verfahren.

Zur statistischen Signifikanzprüfung der Körpergewichts- sowie der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism verwendet. Im Falle der Gewichtskurven wurde dabei für die einzelnen Zeitpunkte ein Student'scher t-Test für unabhängige Stichproben angewendet, um die Unterschiede des mittleren Körpergewichts der beiden Gruppen SPBN und SPBN-DOG4 auf Signifikanz zu prüfen. Bei den Überlebenskurve wurde der Unterschied der Überlebenszeit beider Gruppen mittels Logrank-Test auf Signifikanz überprüft.

5 Ergebnisse

5.1 Auswirkung unterschiedlicher Infektionsrouten auf die Klinik der Infektion

Bei der Infektion von Mäusen wurden die verwendeten Viren intranasal (i.n.) inokuliert. Dieser Weg der Infektion ist ein eher experimenteller Weg, der aber den Vorteil hat, dass einerseits auch RV-Stämme, die sich bei der Gabe in den Muskel als apathogen erweisen, ins ZNS eingebracht werden können und zum Anderen das Auftreten von Krankheitssymptomen zeitlich sehr homogen in einzelnen Versuchsgruppen auftritt. Unter Verwendung dieses Infektionsweges analysierten wir die Infektiosität und Pathogenität der zwei RV-Stämme SPBN und SPBN-DOG4.

Infektionsversuche, bei denen die beiden Stämme in den Muskel inokuliert wurden, zeigten, dass nur aufgrund des Austausches des Glykoproteins der SPBN-DOG4-Stamm hochpathogen war und zu einer RV-Erkrankung führte, wohingegen der SPBN-Stamm apathogen war und keine RV-Erkrankung auslöste (s. Abb. 19 B).

Im Gegensatz zu diesem peripheren Infektionsweg erwiesen sich beide RV-Stämme (SPBN und SPBN-DOG4) bei i.n. Inokulation als pathogen. Messungen des Körpergewichts zeigten am Tag 6 nach Infektion eine deutliche Abnahme (s. Abb. 20). Der ehemals apathogene SPBN-Stamm führte erstaunlicherweise zu einer signifikant stärkeren Gewichtsabnahme der Tiere als der SPBN-DOG4-Stamm. Trotz der unterschiedlichen Gewichtsabnahmen zeigten sich in beiden Versuchsgruppen klinische Symptome einer Rabies-Erkrankung im präfinalen Stadium. Diese sind Dehydratation, Apathie, Verhaltensauffälligkeiten sowie Koordinationsstörungen (vgl. Abschnitt 4.3). Die anhand einer Kaplan-Meier-Kurve berechneten mittleren Überlebensraten zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen. Die mittlere Überlebenszeit für SPBN betrug 9 Tage p.i., die für SPBN-DOG4 11 Tage p.i. (s. Abb. 19 A).

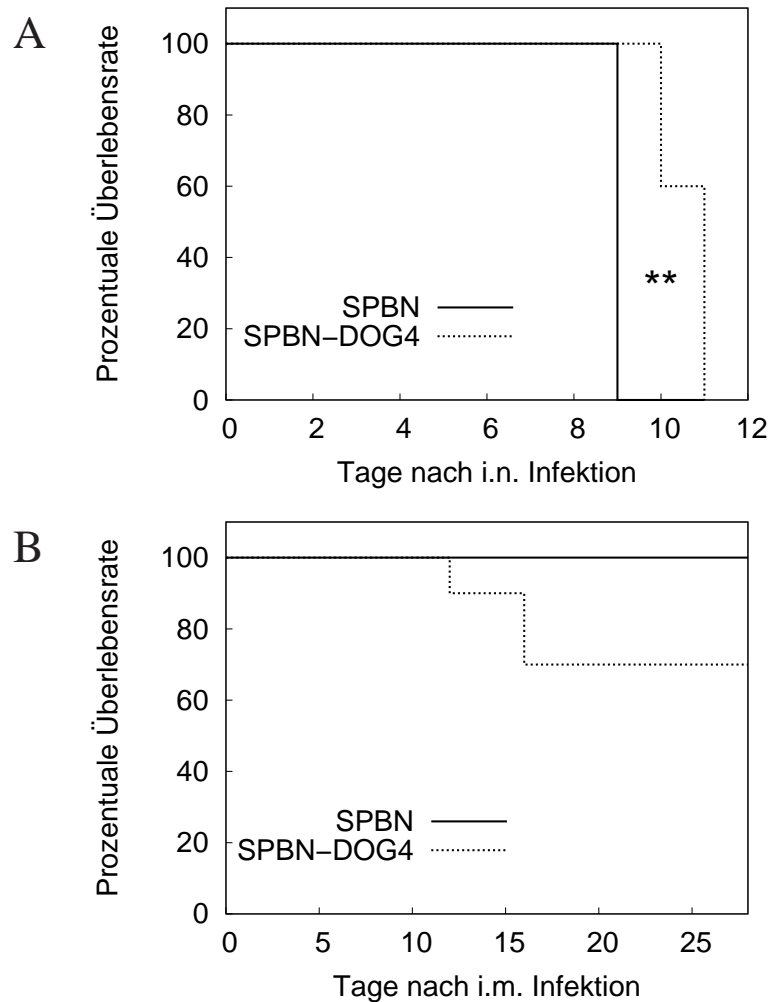


Abbildung 19: Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen nach i.n. (A) sowie i.m. (B) Infektion mit SPBN und SPBN-DOG4 mittels Kaplan-Meier-Analyse. *** $p \leq 0,005$ (in A: $n=10$, in B $n=5$). B: Daten nach M. Bertoune und B. Dietzschold, mit freundlicher Erlaubnis.

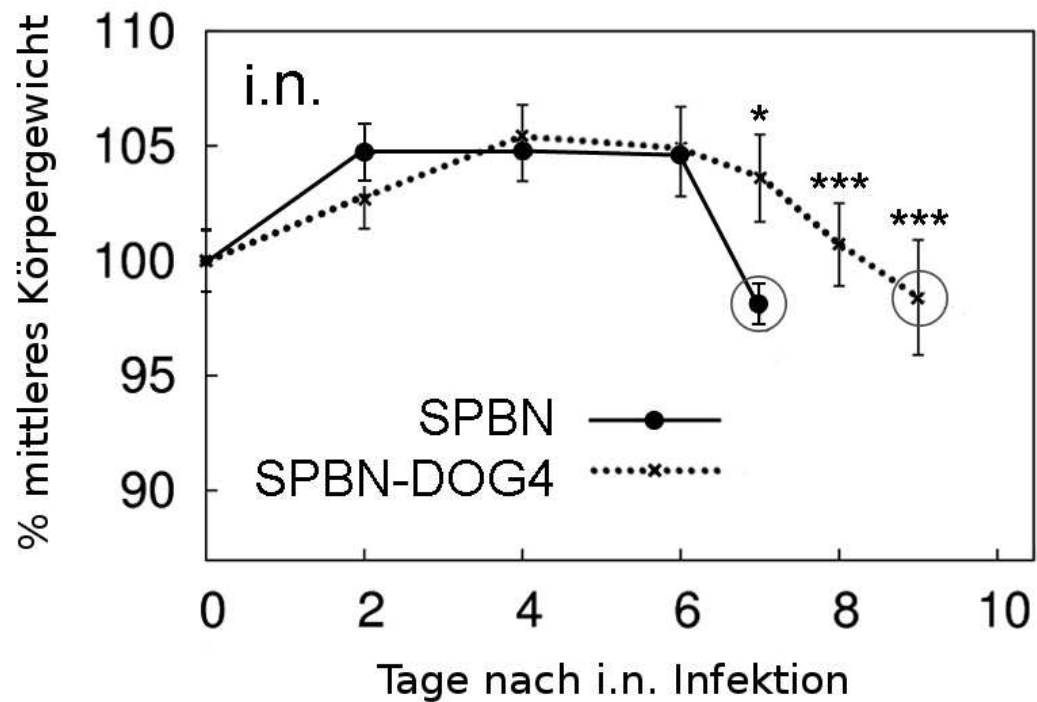


Abbildung 20: Verlauf der Entwicklung des Körpergewichts nach i.n. Infektion mit SPBN und SPBN-DOG4. Dargestellt sind prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion, bezogen auf das mittlere Körpergewicht \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100% gesetzt. Die Kreise markieren die Zeitpunkte, an denen die Mäuse getötet wurden. $n = 12$; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

5.2 Virus-Quantifizierung

5.2.1 PCR-Analyse

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede in der mittleren Überlebenszeit auf unterschiedlich hohen Virusraten im ZNS beruhen, wurde die Anzahl an RV-Partikeln im ZNS mittels quantitativer real-time PCR analysiert. Hierzu wurden frontale Abschnitte ganzer Gehirne auf die Anwesenheit von genomischen RV-Äquivalenten gemessen. Diese molekulargenetisch gemessenen Äquivalente sind Virus-RNA-Fragmente, die die Anzahl der Virus-Partikel direkt repräsentieren. Es zeigte sich, dass ein umgekehrtes Verhältnis von Virus-Last und mittlerer Überlebenszeit besteht: In den Gehirnen der mit SPBN infizierten Tiere waren signifikant weniger Virus-Äquivalente nachzuweisen als in den Gehirnen der mit SPBN-DOG4 infizierten Tiere (s. Abb. 21).

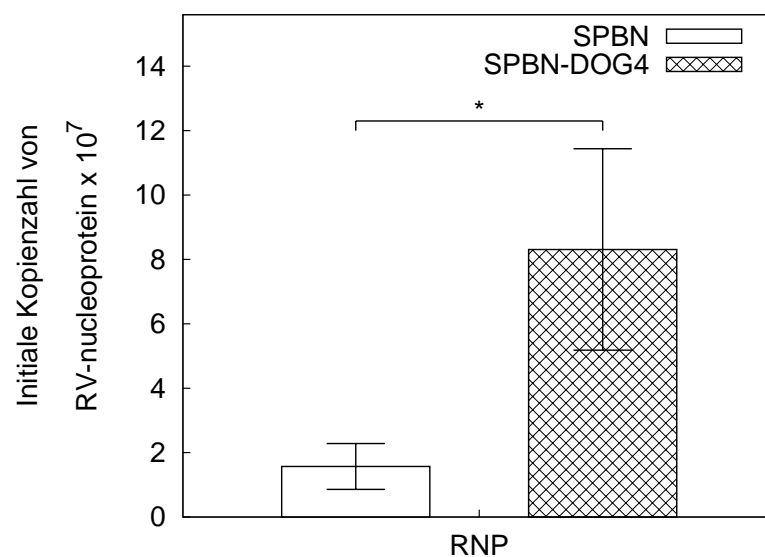


Abbildung 21: Absolute Quantifizierung von genomischen RV-Äquivalenten pro μg RNA mittels quantitativer PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Balken geben die Standardabweichung an. $n = 3$; $*p \leq 0,05$.

5.2.2 Immunhistochemische Analyse

Bei der histologischen Auswertung mittels der hochauflösenden Hellfeldmikroskopie zeigten sich morphologische Unterschiede in der subzellulären Verteilung von RV-G zwischen den Virus-Stämmen SPBN und SPBN-DOG-4: Viren vom SPBN-Stamm zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur einen Teil der hippocampalen Neurone befallen, einer Struktur im ZNS, für die Rabies-Viren unterschiedlichster Stämme eine hohe Präferenz aufweisen (s. Abb. 22 A). Weiterhin liegt das Glykoprotein in der einzelnen mit SPBN infizierten Zelle homogen verteilt im Soma und den Dendriten vor (s. Abb. 22 B). Die Expressionsspiegel des RV-G innerhalb eines Neurons sind signifikant höher als die des SPBN-DOG4-Stammes.

Der SPBN-DOG4-Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass er praktisch alle Neurone im Stratum pyramidale des Hippocampus infiziert (s. Abb. 22 C). Allerdings bleibt bei SPBN-DOG4 das Glykoprotein auf den Bereich des Somas beschränkt und findet sich nicht in den Dendriten (s. Abb. 22 D). Damit zeigt sich eine vergleichsweise niedrigere Expressionsrate des Glykoproteins vom Typ SPBN-DOG4 in der einzelnen Zelle (s. Abb. 23).

Bei Infektion mit SPBN-DOG4 ist aufgrund der ubiquitären Expression in allen hippocampalen Neuronen die Menge an Glykoprotein im gesamten Hippocampus signifikant erhöht gegenüber der im SPBN-infizierten Tier (s. Abb. 24). Gleiches gilt für die Quantifizierung des RNP-Komplexes. Auch hier ist die Menge an RNP in den SPBN-DOG4-Tieren signifikant gegenüber der in den SPBN-Tieren erhöht (s. Abb. 24).

Auf zellulärer Ebene zeigten sich auch Unterschiede in den Expressionsspiegeln von RNP, die denen des RV-G ähnelten: Die Zelluläre Expression von RNP zeigte sich in der SPBN-Gruppe gegenüber der SPBN-DOG4-Gruppe erhöht. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Damit unterstützt die semiquantitative Bildanalyse die bereits in der quantitativen Bildanalyse ermittelten Unterschiede in der Virus-Last von mit SPBN und

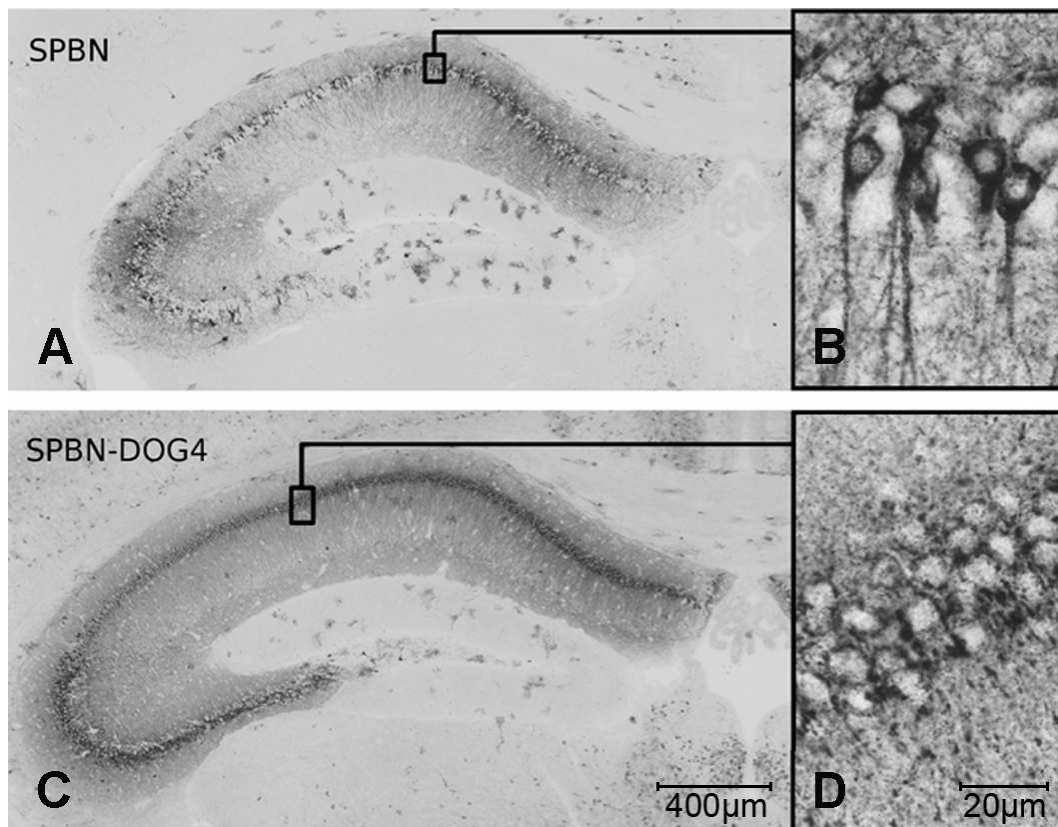


Abbildung 22: Repräsentative immunhistochemische Färbung des RV-Glykoproteins (RV-G) im Hippocampus von Mäusen, die mit SPBN (A, B) bzw. SPBN-DOG4 (C, D) i.n. infiziert wurden. Bemerkenswert ist die starke RV-G Expression einzelner Neurone bei Infektion mit SPBN und die diffus über beinahe alle Neurone verbreitete RV-G Expression bei Infektion mit SPBN-DOG4. B und D stellen stärker vergrößerte Ausschnitte der mikroskopischen Aufnahmen A und C dar.

SPBN-DOG4 infizierten Tieren. Ein bedeutender Befund im Hinblick auf die Vorstellung, dass niedrigere Virus-Last und niedrigere Glykoprotein-Spiegel zu einer erhöhten Pathogenität des jeweiligen Virus-Stammes beitragen, ist, dass klar differenziert werden muss zwischen der Virus-Last im gesamten Gehirn und der Virus-Last innerhalb einzelner Neurone. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine allgemein geringe Virus-Last nicht unmittelbar auch bedeutet, dass die Synthese von Virus-Partikeln in einzelnen Neuronen gering ist.

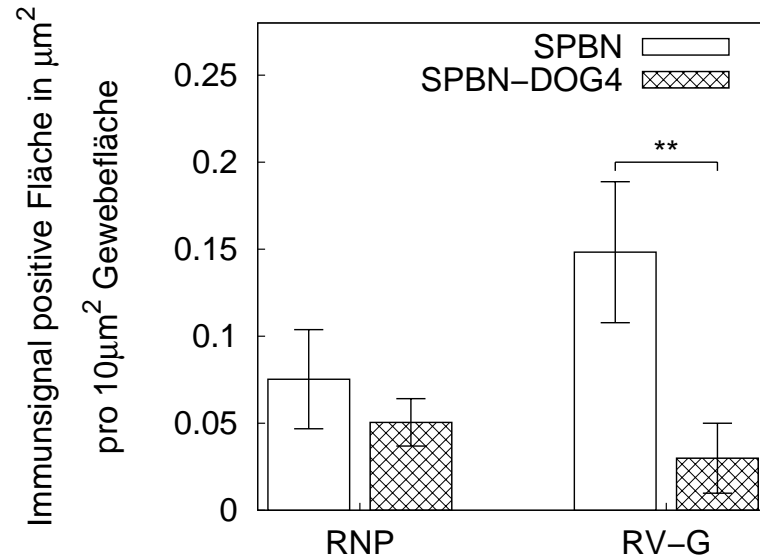


Abbildung 23: Semiquantitative Bildanalyse der RV-RNP-Expression sowie der RV-G-Expression auf zellulärer Ebene. Auswertung von jeweils 120 einzelner, immunhistochemisch gefärbter Neurone. Die RNP-Expression zeigt eine direkte Korrelation mit der Anzahl viraler Partikel. $n = 4$; $**p \leq 0,01$.

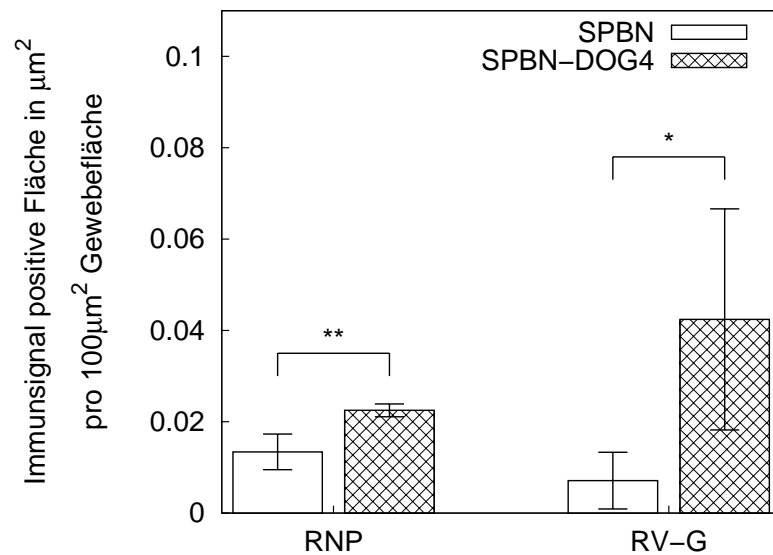


Abbildung 24: Semiquantitative Bildanalyse der Expression von RNP und RV-G im Hippocampus nach i.n. Infektion von Mäusen mit SPBN bzw. SPBN-DOG4. Kontrolle: Nicht infizierte Kontrolltiere. Bei den nicht infizierten Kontrolltieren waren keine viralen Proteine nachweisbar; die entsprechenden Balken wurden deshalb nicht dargestellt. $n = 4$; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$.

Abb. 25 zeigt Zellen des Hippocampus einer mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Maus bei 600-facher Vergrößerung. Es handelt sich hierbei um eine Fotomontage, die aus zwei Aufnahmen derselben, doppelt gefärbten Zelle entstand. Die grüne Fluoreszenz markiert die RV-G-Expression. Die RNP-Färbung wurde mittels Hellfeld-Mikroskopie aufgenommen – die ursprünglich schwarze Färbung wurde digital in Falschfarben umgewandelt und ist hier rot dargestellt. Die zwei Bilder wurden dann überlagert, so dass das Verteilungsmuster von RNP- und RV-G-Expression auf zellulärer Ebene veranschaulicht wird.

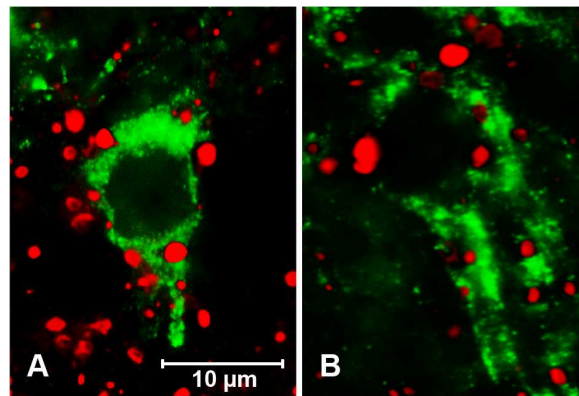


Abbildung 25: Doppelmarkierung der RNP- (rot) und RV-G- (grün) Expression auf zellulärer Ebene. Abgebildet sind Neurone des Hippocampus, die mit SPBN (A) bzw. SPBN-DOG4 (B) infiziert wurden. Die beiden mikroskopischen Aufnahmen wurden aus jeweils zwei Fotos derselben Zelle zusammengesetzt. Diese wurden digital überlagert, so dass die Verteilung der RNP- und RV-G-Expression auf zellulärer Ebene verdeutlicht wird. Die RNP-Färbung wurde mittels Hellfeld-Mikroskopie aufgenommen und die ursprünglich schwarzen signalintensiven Bereiche wurden digital in Falschfarben umgewandelt (rot) und dieses Bild über das fluoreszenzmikroskopisch aufgenommene Bild der RV-G-Färbung gelagert.

5.3 Analyse der Immunantwort

Da die Pathogenität eines RV-Stammes auch darüber bestimmt wird, wie immunogen dieser Virus-Stamm ist, wurde der Titer an Virus-neutralisierenden Antikörpern (VNA) in den zwei mit den unterschiedlichen Viren infizierten Mäusen quantifiziert. Es ist bekannt, dass gegen das Glykoprotein gerichtete VNA im Rahmen einer humoralen Immunantwort gebildet werden. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in der Regel das Virus durch einen Biss in Haut oder Muskel in die Peripherie des Wirtes eindringt. VNA hemmen dann die retrograde Ausbreitung der Viren zum ZNS. Wir analysierten, ob und in welchem Maße VNA gebildet werden, wenn das Virus über den intranasalen, ZNS-nahen Infektionsweg direkt ins Gehirn gelangt. Darüber hinaus stellten wir die Frage, ob ein erhöhter Titer an VNA einen Einfluss auf die mittlere Überlebenszeit der ansonsten für beide Virus-Stämme letalen Erkrankung ausübt. Die Bestimmung der Titer von VNA im Serum infizierter Tiere ergab, dass beide Virus-Stämme die Bildung von VNA induzierten. Allerdings war der Spiegel der VNA in den mit SPBN-DOG4 infizierten Tieren signifikant erhöht gegenüber denen der mit SPBN infizierten Tiere. Gegenüber den Kontrolltieren bilden die mit SPBN infizierten Mäuse keinen signifikanten VNA-Titer (s. Abb. 26). Erhöhte VNA-Spiegel korrelieren somit mit der beobachteten, längeren mittleren Überlebenszeit der mit SPBN-DOG4 infizierten Tiere.

Ein VNA-Assay dient der Bestimmung der VNA-Titer im Serum nach RV-Infektion (zur Durchführung s. Abschnitt 4.4, zur Auswertung s. Abschnitt 4.4.6). Wir berechneten die Mittelwerte der VNA-Titer, die aus den einzelnen Serum-Proben bestimmt wurden. Die nebenstehende Abbildung veranschaulicht, dass die VNA-Produktion der mit SPBN-DOG4 infizierten Tiere signifikant gegenüber der mit SPBN infizierten Tiere erhöht ist. Gegenüber den Kontrolltieren bilden die mit SPBN infizierten Mäuse keinen signifikanten VNA-Titer (s. Abb. 26).

Die Anwesenheit von VNA in beiden Versuchsgruppen bedeutet aber auch, dass in beiden Tieren eine Immunreaktion erfolgt, die möglicherweise auch direkt im infizierten Gehirn stattfindet. Auch mögliche Unterschiede in der Stärke der Aus-

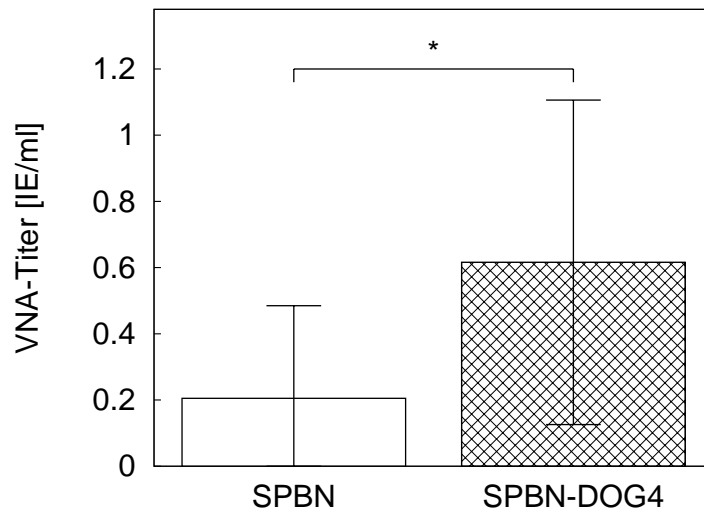


Abbildung 26: Mittelwerte der VNA-Titer bestimmt aus den Seren von nicht-infizierten Kontrolltieren sowie von mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Mäusen. Die Proben wurden direkt vor dem Tod entnommen und die VNA-Titer in Bezug auf das WHO Standard-Serum berechnet. $n = 7$; $*p \leq 0,05$. Die Balken kennzeichnen die Standardabweichung.

prägung lokaler Entzündungen im ZNS wären denkbar. Um lokale, das Immunsystem regulierende Entzündungsreaktionen quantitativ nachzusehen, wurden die mRNA-Spiegel von IL-6, IL-10, IFN- β sowie der IFN- γ in Hirn-Homogenaten der jeweils anterioren Hälfte des Gehirns bestimmt. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Zytokin-mRNA durch die Virus-Infektion induziert bzw. im Falle von IL-6 erhöht waren (s. Abb. 27). Die am stärksten erhöhte mRNA war die für IFN- β . Signifikante Unterschiede zwischen den mRNA-Spiegeln von mit SPBN und SPBN-DOG4 infizierten Hirnen zeigte sich für IL-6, IL-10 sowie die Interferon-mRNA für IFN- β und IFN- γ waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den zwei Versuchsgruppen. Dies lässt vermuten, dass die Virus-Infektion im ZNS im Wesentlichen unabhängig vom Virus-Stamm zur Synthese von Entzündungsabhängiger Zytokin-mRNA führt.

Die Quantifizierung der Zytokin-mRNA für IL-6, IL-10, IFN- β sowie der IFN- γ erfolgte relativ zur ubiquitär vorkommenden 18s RNA (s. Abb. 27 B). Zur RNA-Gewinnung wurden jeweils die anterioren Hälften der Gehirne von Mäusen verwendet, die i.n. mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infiziert worden waren. Der mean

fold change (f.c.) beschreibt dabei den tatsächlich gemessenen Unterschied zwischen infiziertem Tier und Kontrolltier als n-fache Änderung des Mittelwertes der gemessenen Fluoreszenzintensität.

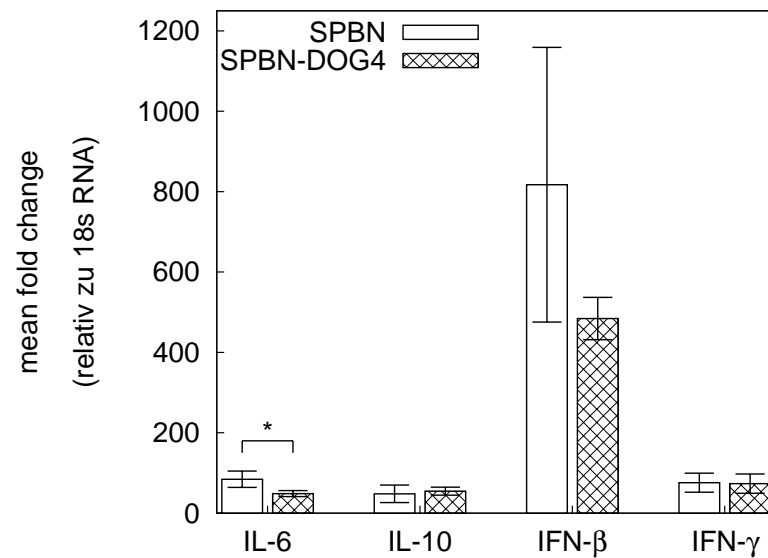


Abbildung 27: Die Quantifizierung der IL-6, IL-10, IFN-β sowie der IFN-γ mRNA erfolgte relativ zur 18s RNA in mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Gehirnen. Deren Werte sind als mean fold change (f.c.) in Relation zu nicht infizierten Tieren dargestellt, die Balken geben die Standardabweichung an. $n = 3$; $*p \leq 0,05$.

5.3.1 Glia-Aktivierung

Neben der im Wesentlichen durch Infiltration von Leukozyten getragenen Entzündungsreaktion im Virus-infizierten Gehirn stellt sich darüber hinaus die Frage nach lokalen Abwehrreaktionen durch Makro- und Mikroglia.

Um eine mögliche Mikroglia- bzw. Astroglia-Aktivierung infolge der Infektion nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten angefertigt. Verwendung fanden dabei spezifische Antikörper, die gegen das Astrozyten-spezifische GFAP (glial fibrillary acidic protein) und gegen Iba-1 (ionized Ca^{2+} binding adapter 1) als Makrophagen- / Mikrogliamarker gerichtet waren. Die Hellfeld-Bildanalyse der immunhistochemischen GFAP-Färbung zeigte eine stärkere Expression von GFAP in beiden RV-infizierten Gehirnen, verglichen mit den nicht infizierten Kontrolltieren (s. Abb. 28 A bis C). Eine semiquantitative Bildanalyse mittels MCID im Bereich des Hippocampus ergab, dass die Immunreaktivität bei Infektion sowohl mit SPBN als auch mit SPBN-DOG4 gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren signifikant erhöht war (s. Abb. 29).

Um die Mikroglia-Aktivierung zu verifizieren, wurden morphologische Veränderungen erfasst; Orientierung bot dabei die etablierte Klassifikation [11], basierend auf zytomorphologischen Strukturmerkmalen. Im ZNS nicht infizierter Kontrolltiere exprimieren Mikroglia-Zellen den typischen Phänotyp ramifizierter Mikroglia mit kleinem Soma und dünnen Fortsätzen (s. Abb. 28 F). In den Gehirnen aller infizierten Tiere war die Mikroglia aktiviert, d.h. die Zellen zeigten vergrößerte, dichtere Somata und vermehrte, verdickte Fortsätze (s. Abb. 28 D und E). Zudem war der Anteil Iba-1-positiver Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren signifikant erhöht (s. Abb. 28 D bis F). Die semiquantitative MCID-Bildanalyse des Hippocampus zeigte eine signifikante Erhöhung der Iba-1-Expression im ZNS von mit SPBN-DOG4 infizierten Mäusen sowohl gegenüber mit SPBN infizierten Mäusen als auch gegenüber nicht infizierten Mäusen (s. Abb. 29).

In Zusammenhang mit einer verlängerten Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen, die i.n. mit SPBN-DOG4 infiziert wurden, legen diese Daten nahe, dass auch die Ausprägung der lokalen Glia-Antwort den Progress der Erkrankung verzögern

kann.

Anhand einer mathematischen linearen Korrelation der RNP- und Iba-1-Expression ergab sich eine direkte Abhängigkeit von Gesamt-Viruslast und Aktivierungsgrad der Mikroglia, wobei die Viruslast geringer ist, je stärker die erfasste Mikroglia ausfällt.

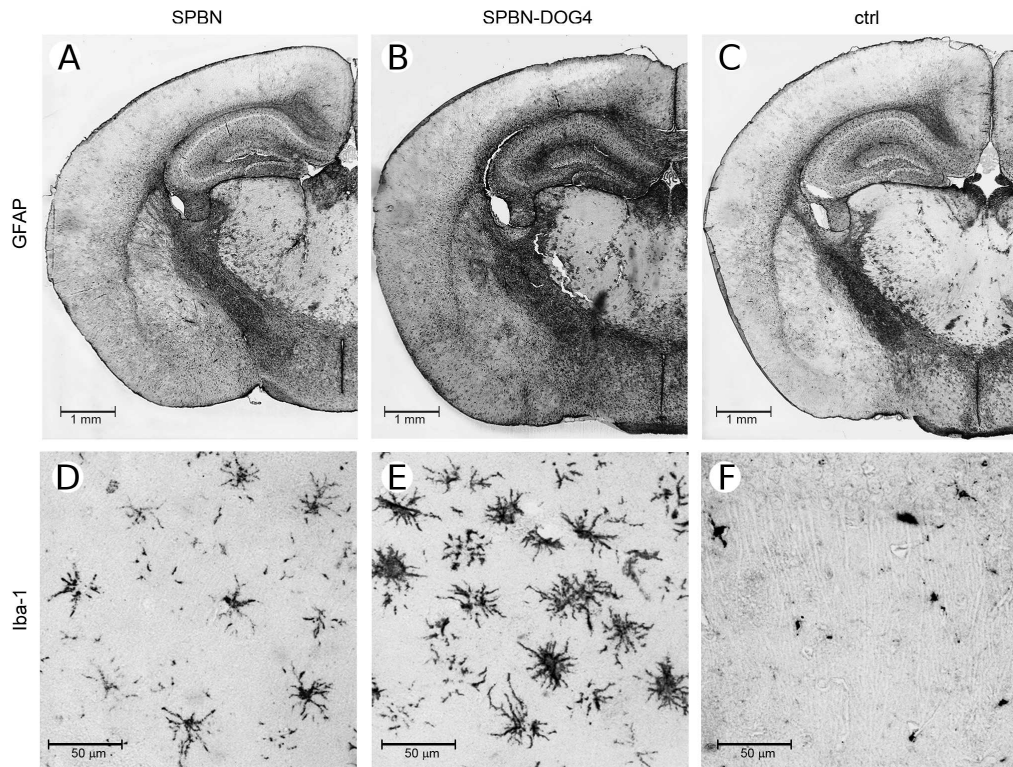


Abbildung 28: Repräsentative immunhistochemische Färbung von GFAP bei geringer (A, B, C) und von Iba-1 bei starker Vergrößerung (D, E, F). Aufnahmen im Bereich des Hippocampus von mit SPBN (A, D) bzw. SPBN-DOG4 infizierten Mäusen (B, E). Im Vergleich dazu nicht infizierte Kontrolltiere (C, F).

Mit den gewonnenen Daten führten wir mehrere Einzelwertanalysen durch und konnten dabei eine lineare Korrelation der RNP- und der Iba-1-Expression feststellen, was auf eine direkte Korrelation von Gesamt-Viruslast und Mikrogliaproliferation hindeutet (s. Abb. 30).

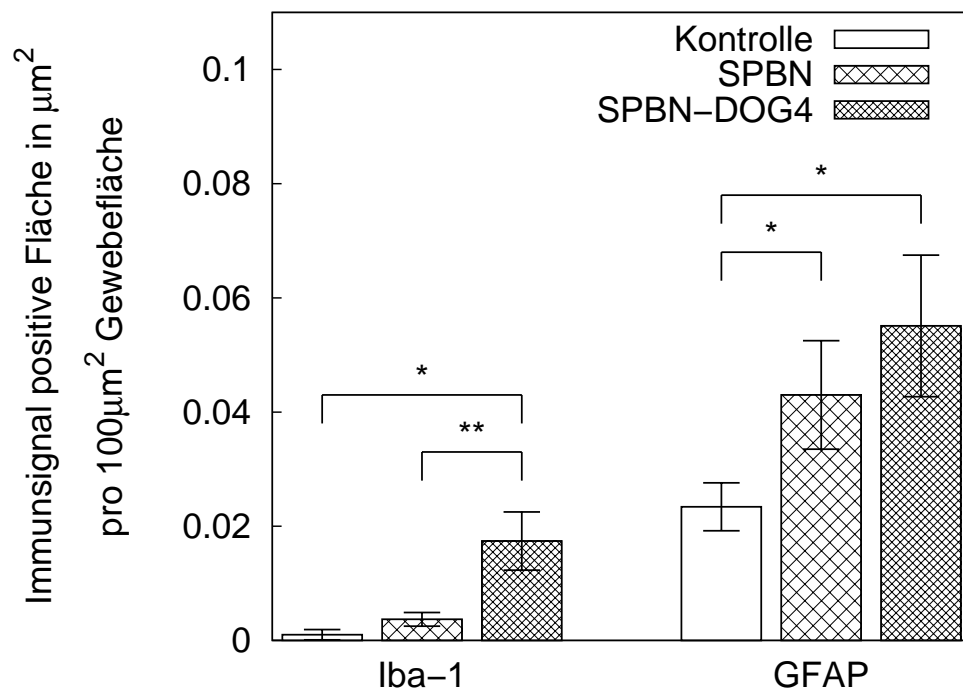


Abbildung 29: Semiquantitative Bildanalyse der Expression von Iba-1 als Mikroglia- und GFAP als Astroglia-Proliferationsmarker im Hippocampus nach i.n. Infektion von Mäusen mit SPBN bzw. SPBN-DOG4. Kontrolle: Nicht infizierte Kontrolltiere. $n = 4$; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$.

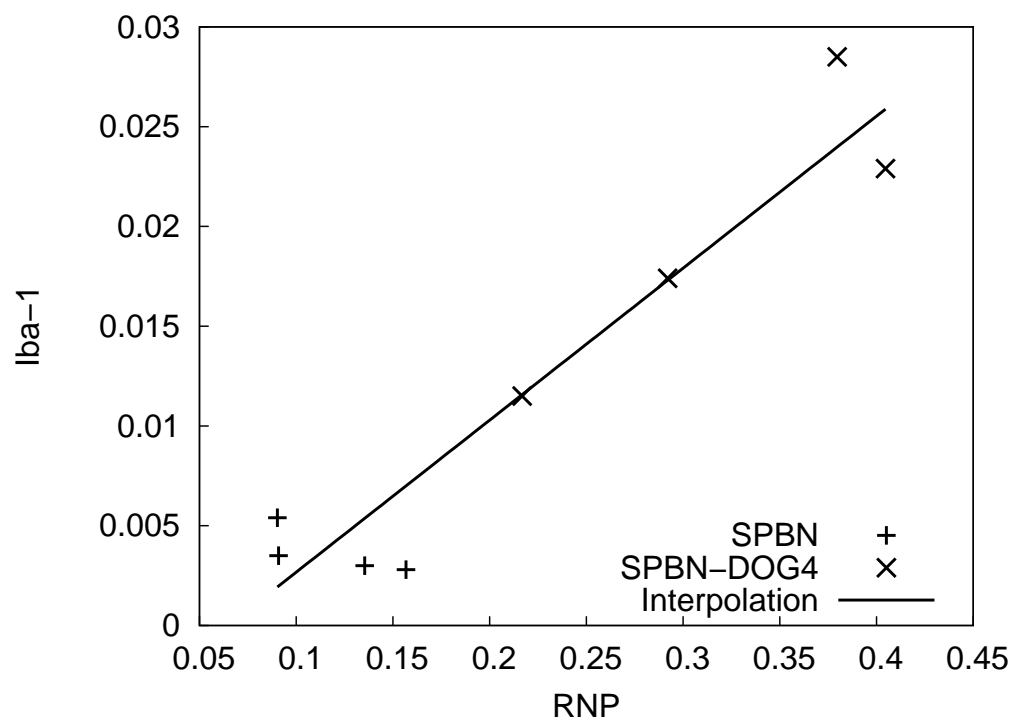


Abbildung 30: Einzelwertanalyse: Linearer Zusammenhang zwischen RNP- und Iba-1-Expression im Hippocampus. Interpolationsmethode: Methode der kleinsten Quadrate (ordinary least squares, OLS) mittels Gnuplot. Angegeben ist jeweils die Immunsignal-positive Fläche in μm^2 pro $100\mu m^2$ Gewebefläche.

5.3.2 T-Zell Infiltration

Zum Nachweis einer eventuell vorhandenen T-Zell-Infiltration ins ZNS führten wir CD3-Färbungen durch. Dabei konnte weder bei mit SPBN noch mit SPBN-DOG4 infizierten Tieren ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes Vorhandensein CD3-positiver Zellen festgestellt werden. Es wird demnach weder bei Infektion mit SPBN noch mit SPBN-DOG4 eine T-Zell-Infiltration des ZNS induziert.

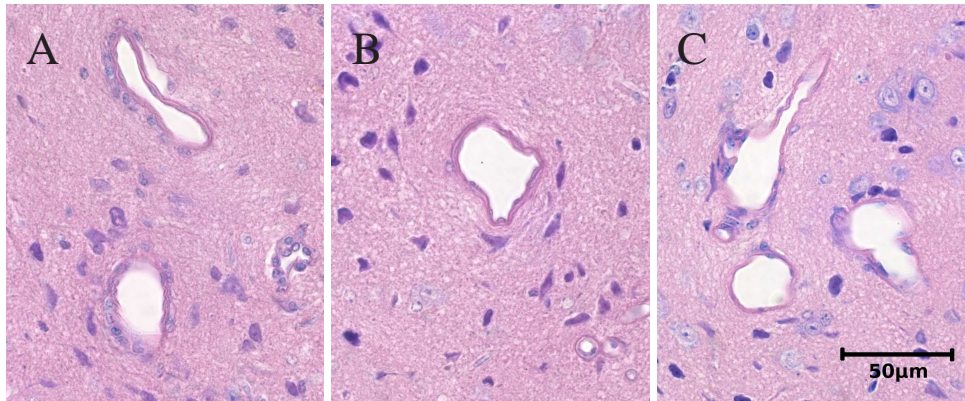


Abbildung 31: Giemsa-Färbung von Gefäßen im Bereich des Lemniscus medialis zur Darstellung einer eventuellen paravasalen Zellinfiltration ins ZNS. Diese konnte nicht nachgewiesen werden. Alle Aufnahmen in gleichen Maßstab bei ca. 400-facher Vergrößerung. A: Infektion mit SPBN, B: Infektion mit SPBN-DOG4, C: nicht-infiziertes Kontrolltier.

5.3.3 Apoptose-Nachweis

Zur Klärung der Frage, ob die Induktion von Apoptose ein pathogenetisches Merkmal einer der von uns untersuchten RV-Stämme ist, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Als Positivkontrolle diente dabei ein Ischämiegeschädigtes Gehirn einer Maus. Es ist sowohl die zerebrale Ischämie ein etabliertes Modell zur Induktion von Apoptose wie auch die TUNEL-Färbung zum Nachweis derselben [16,73,142].

Weder bei SPBN- noch bei SPBN-DOG4-infizierten Tieren konnte ein ähnliches Färbungsmuster wie bei der Positivkontrolle festgestellt werden. Wir schließen daraus, dass bei i.n. Infektion weder mit SPBN noch mit SPBN-DOG4 Apoptose im ZNS induziert wird.

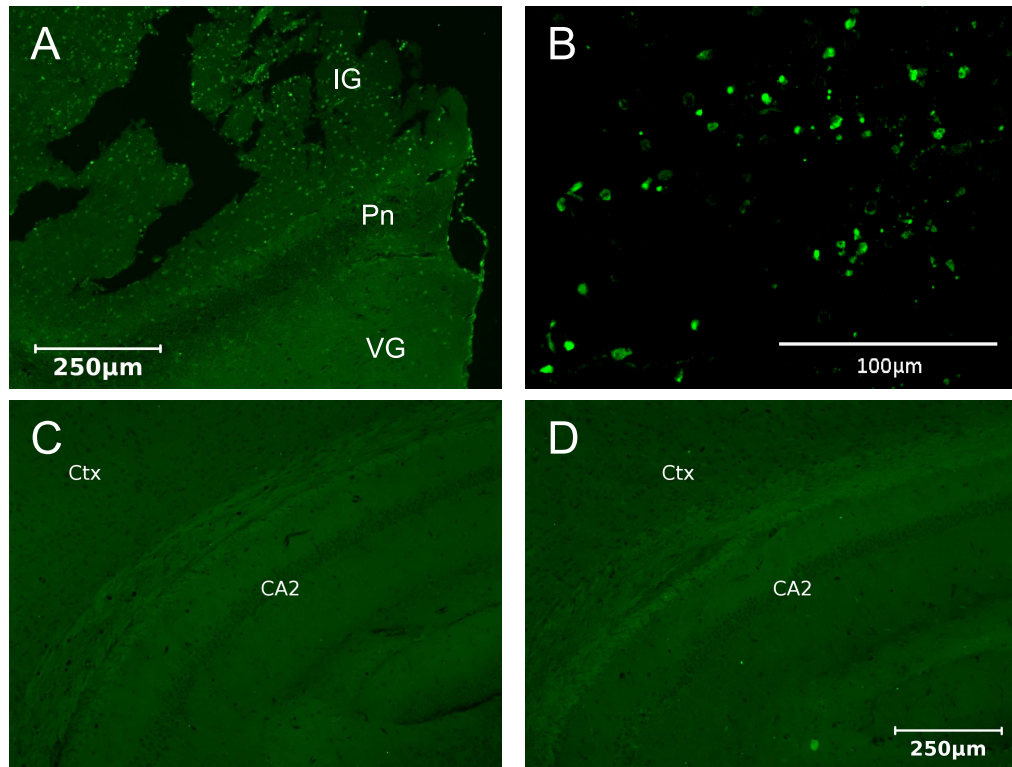


Abbildung 32: TUNEL-Färbung: Ischämiegeschädigtes Gehirn als Positiv-Kontrolle (A und B). Aufnahmebereich: Kortex in 100-facher (A) und 400-facher Vergrößerung. Deutlich sind apoptotische Zellen im Bereich des ischämischen Areals (Ischämisches Gewebe, IG) erkennbar. Abgegrenzt durch die Penumbra (Pn) ist vitales Gewebe (VG) in Aufnahme A zu sehen. Aufnahmen C und D zeigen das Gehirn einer i.n. mit SPBN (C) und SPBN-DOG4 (D) infizierten Maus in jeweils gleichem Maßstab. Weder in Aufnahme C noch in Aufnahme D zeigt sich das Ischämie-typische Färbemuster wie in Aufnahme A bzw. B. CA2: Regionen 2 des Hippocampus (Cornu ammonis); Ctx: Kortex; IG: ischämisch geschädigtes Gewebe; VG: vitales Gewebe; Pn: Penumbra.

5.3.4 Autophagie

Mittels immunhistochemischer LC3B-Färbung können Autophagosomen sichtbar gemacht werden. Finden autophagosomale Prozesse statt, so bilden diese spezifische morphologische Formationen. Als Positivkontrolle diente Glioblastomgewebe (im ZNS einer Maus, B/H-fixiert). Die im Referenzgewebe gefundenen spezifischen Autophagosomen-Anordnungen ließen sich jedoch in den mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Gehirnen nicht regelmäßig beobachten, so dass sich aus unseren Beobachtungen keine eindeutige Aussage bezüglich der Induktion von Autophagie

formulieren lässt.

Nachfolgend sind in Abb. 33 die gewonnenen Daten noch einmal in übersichtlicher, tabellarischer Form dargestellt.

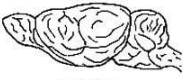


		SPBN	SPBN-DOG4	Signifikanz
Mortalität [Tage p.i.]	Mittlere Überlebenszeit	9	11	**
VNA [IE/ml]		205	616	*
Max. Körper- gewichts- verlust		12%	4%	
 ZNS	RV genomische Äquivalente	+	+++	*
	RV-G	+	+++	*
 Neuron	RNP	+	+	n.s.
	RV-G	+++	+	**
Zytokine [relativ zu 18s RNA]	IL-6 mRNA	73	42	*
	IL-10 mRNA	48	55	n.s.
	IFN- β mRNA	505	300	n.s.
	IFN- γ mRNA	76	73	n.s.
 Glia	Mikroglia Aktivierung	+	+++	**
	Astroglia Aktivierung	+	++	n.s.

Abbildung 33: Zusammenfassung der Ergebnisse: Überlebenszeit, RV genomische Äquivalente sowie RV-G im gesamten ZNS verglichen mit der zellulären Expressionsrate. Des weiteren sind die Glia-Aktivierung und die Zytokin-mRNA-Expression dargestellt. RV-G bzw. RNP beziehen sich auf die jeweilige neuronale Proteinexpression. Signifikante Unterschiede der beiden mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 infizierten Gruppen wurden folgendermaßen gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant; + nachweisbar, ++ vermehrt nachweisbar, +++ stark vermehrt nachweisbar; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

6 Diskussion

Im Gegensatz zu RV-Wildtyp-Stämmen, welche unabhängig von ihrer Inokulationsroute hochpathogen sind, unterscheiden sich RV-Laborstämme insbesondere bei peripherer Infektion stark in ihrer Pathogenität. Es ist bekannt, dass das Glykoprotein für die Pathogenität eines RV-Stammes eine Zentrale Bedeutung hat. Es bestimmt den Gewebetropismus, die Neuroinvasivität sowie die Stärke der Immunreaktionen [36, 40, 50, 97]. Dies trifft insbesondere bei peripherer Inokulation in Haut oder Muskel zu, wie es bei Kratz- oder Bisswunden vorkommt. Hochgradig attenuierte RV-Stämme sind dagegen nicht befähigt, bei peripherer Inokulation eine RV-Erkrankung auszulösen. Dennoch sind viele attenuierte RV-Stämme pathogen, sobald sie mittels experimenteller Infektionsroute (i.n. oder i.c.) direkt ins ZNS inokuliert werden. Der Unterschied zwischen attenuierten und pathogenen Rabies-Viren in Bezug auf ihre Fähigkeit, das ZNS von einer peripheren Inokulationsstelle aus zu infiltrieren, basiert nicht nur auf ihrem unterschiedlichen Neurotropismus, sondern auch auf der viralen Replikations- und der Glykoprotein-Expressionsrate [50].

Die Ergründung möglicher zugrundeliegender Mechanismen, die dazu führen dass sich ein RV-Stamm mehr oder weniger pathogen verhält, sobald er das ZNS erreicht hat, ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der RV-Erkrankung und für die Entwicklung neuer Postexpositions-Behandlungsmethoden, welche auch noch in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien angewendet werden können. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass neben RV-G auch das RV-Matrixprotein einen entscheidenden Einfluss auf das Ausbreitungsverhalten der Viren im ZNS sowie deren Replikationsstärke haben muss [144]. Die Einflüsse des Glykoproteins sind bislang jedoch besser belegt.

Durch den Austausch der Glykoprotein-Gensequenz des apathogenen RV-Laborstammes SPBN durch die des pathogenen Wildtyp-Stammes DOG4 konnten die Neuroinvasivität und die Pathogenität dieses Stammes (fortan bezeichnet als SPBN-DOG4) deutlich erhöht werden, was sich in einer 30%-igen Mortalitätsrate bei peripherer i.m. Infektion widerspiegelte. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beob-

achtungen der zentralen Rolle des RV-G für die Pathogenität bei peripherer Inokulation überein [36]. Die Erhöhung der Mortalität auf 30%, jedoch nicht auf 100% legt nahe, dass RV-G ein essenzieller, allerdings nicht der alleinige Faktor ist, der die Pathogenität des RV bestimmt. Dies wurde bereits für den Wildtyp-RV-Stamm SHBRV-18 gezeigt [50].

Bei der i.n. Inokulation gelangt das RV über den Nervus olfactorius direkt ins ZNS [95]. Denkbar ist auch, dass die Viren über den Nervus trigeminus ins ZNS übertreten. Der Vorteil dieser experimentellen Infektionsroute ist, dass die Invasion des ZNS unabhängig von der Neuroinvasivität des Virus-Stammes erfolgt. Es werden dadurch die Infektionshindernisse wie das Überspringen der ersten Synapse vom peripheren Nerven auf das Rückenmark sowie periphere Immunreaktionen umgangen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, das virale Ausbreitungsverhalten, neuronale Veränderungen und lokale Immunreaktionen zwischen hochpathogenen und weniger pathogenen Virusstämmen im ZNS direkt vergleichen zu können. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob Unterschiede in der Pathogenität verschiedener Virus-Stämme ausschließlich durch periphere oder zusätzlich durch spezifische Einflüsse auf Neurone oder Gliazellen des ZNS hervorgerufen werden.

Eine Virus-Replikation im ZNS stimuliert die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-(HHN)-Achse [10, 164]. Dies wurde auch für pathogene RV-Stämme nachgewiesen, ebenso deren regelrechte Infektion des Hypothalamus [156, 172], was zu einer erhöhten Produktion von Steroidhormonen führt [172]. Es ist anzunehmen, dass bei Infektion mit Rabies-Viren vom Stamm SPBN die HHN-Achse stärker stimuliert wird als bei Infektion mit SPBN-DOG4. Dies kann die verminderte zerebrale Inflammation sowie den stärkeren Gewichtsverlust der mit SPBN infizierten Mäuse erklären. Zur Verifikation dieser These könnten in weiteren Versuchen ACTH und Cortisol im zeitlichen Verlauf nach Infektion mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 bestimmt werden.

Durch die Verwendung der experimentellen i.n. Infektionsroute erreichte die Mortalitätsrate für beide RV-Stämme gleichermaßen 100%. Bei anderen attenuierten RV-Stämmen war dieses Verhalten nicht zu beobachten: Der RV-Stamm CVS-F3

wurde von immunkompetenten Mäuse innerhalb von 8 bis 10 Tagen nach i.n. Infektion durch Induktion einer Immunreaktion einschließlich der Produktion von VNA aus dem ZNS beseitigt. Diese VNA-Produktion ist ein entscheidender Faktor, einem letalen Verlauf der RV-Infektion entgegenzuwirken [70].

Im Jahre 2002 beschrieb Faber et al. die positive Korrelation von Glykoproteinexpression und VNA-Produktion [49]. Dieser Effekt war zum einen bei verschiedenen Mengen an inokulierten Viren erkennbar, zum anderen führte aber auch die erhöhte Glykoprotein-Expression des modifizierten Rabies-Virus-Stammes SPBNGA-GA gegenüber einem Stamm mit geringerer Glykoproteinexpression (SPBNGA) zur Ausbildung eines höheren VNA-Titers. Zusätzlich wurde eine signifikant größere Überlebensrate der mit SPBNGA-GA infizierten Tiere beobachtet, was jedoch nicht nur durch den höheren VNA-Titer erklärbar ist – denn wie wir beobachten konnten schützt ein erhöhter VNA-Titer allein nicht vor einem letalen Ausgang der Infektion. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Faber et al. konnten auch wir bei einer erhöhten Gesamt-RV-G Expression einen erhöhten VNA-Titer messen. Dementsprechend wiesen auch Morimoto et al. eine inverse Korrelation von RV-G-Expression und Pathogenität nach [120]. Die erhöhte RV-G-Expression führt zu einer erhöhten Immunogenität, d.h. ein RV-Stamm mit hoher RV-G-Expression wird vom Immunsystem eher „erkannt“ [49]. Eine erhöhte RV-G-Expression kann zelluläre Stressreaktionen anstoßen [48], wodurch u.a. Apoptose induziert werden kann [52]. Pathogene RV-Stämme könnten Immunreaktion also aktiv durch eine gedrosselte RV-G-Expression unterlaufen. In dieser Hinsicht wurden bereits mehrfach Überlegungen einer möglichen Immunevasion (aktive Umgehung von Immunreaktionen) durch das RV publiziert [98, 178].

In Bezug auf die Infektion mit SPBN bzw. SPBN-DOG4 kann gesagt werden, dass keiner dieser beiden RV-Stämme eine adäquate Immunreaktion auslöste, wenngleich beide Stämme eine Mikroglia-Reaktion provozierten und SPBN-DOG4 auch eine signifikante VNA-Produktion induzierte. Die von uns in den mit SPBN-DOG4 infizierten Tieren beobachteten, im Vergleich zur SPBN-Gruppe höheren VNA-Titer, die verstärkte Mikroglia-Antwort und der spätere Eintritt des Todes stim-

men mit früheren Beobachtungen überein, denen zufolge antivirale Immunreaktionen Morbidität und Mortalität (bzw. die mittlere Überlebenszeit) beeinflussen. Wahrscheinlich sind aktivierte Mikroglia-Zellen in den mit SPBN-DOG4 infizierten Mäusen die Quelle erhöhter zerebraler IL-6 mRNA-Spiegel [186]. Möglicherweise führt IL-6 durch einen proinflammatorischen Effekt zu einer Verzögerung des Krankheitsprozesses. Eine Erklärungsmöglichkeit dieses scheinbaren Widerspruchs ist, dass sich Zytokinspiegel im zeitlichen Verlauf schnell verändern. Auch in verschiedenen Regionen des ZNS (Kortex, Zerebellum) können die Zytokinspiegel, insbesondere des IL-6, stark voneinander abweichen und sich gegensinnig verändern [138]. Um dies jedoch genauer zu verifizieren, müssten mehrere Proben im zeitlichen Verlauf genommen werden.

Es konnte festgestellt werden, dass bei SPBN-DOG4-Infektion signifikant mehr Neurone im ZNS befallen wurden als dies bei SPBN-Infektion immunhistologisch beobachtet werden konnte. SPBN-DOG4 verbreitete sich dagegen stärker im ZNS und führte vermutlich deshalb zu einer höheren Gesamt-Viruslast. Dennoch konnte trotz der geringeren Ausbreitung von SPBN ein schwererer und schnellerer Krankheitsverlauf registriert werden. Da sowohl der VNA-Titer im Serum als auch die Glia-Antwort bei Infektion mit SPBN-DOG4 gegenüber SPBN deutlich erhöht waren, kann angenommen werden, dass eine starke lokale Immunantwort im ZNS mit einer verzögerten Krankheitsprogression vergesellschaftet ist und diese insofern neuroprotektiv wirkt. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist die verstärkte Mikroglia-Aktivierung, der ein neuroprotektiver Einfluss zukommt [166]. Interessanterweise zeigte sich in der SPBN-DOG4-Gruppe eine stärkere Immunantwort, obwohl SPBN-DOG4 das Glykoprotein von einem pathogeneren Virus-Stamm besitzt.

Apoptose ist ein pathophysiologischer Mechanismus vieler neurotroper Viren [119]; beschrieben ist dies auch für den hochgradig pathogenen Rabies-Virus-Stamm CVS [78]. Für die RV-Infektion infolge einer peripheren Inokulation konnte gezeigt werden, dass pathogene Viren das Immunsystem umgehen können, indem sie Apoptose in T-Zellen induzieren; infolge dessen können sie sich ungehindert im ZNS ausbreiten. Dahingegen erreichen apathogene RV-Stämme das ZNS nicht, da

sie Apoptose in Neuronen des Rückenmarkes induzieren und eine weitere Ausbreitung ins Gehirn damit ausbleibt [96, 97, 155]. Diese beiden Mechanismen werden hauptsächlich durch das RV-G beeinflusst und sind auch eine Erklärungsmöglichkeit für die Apathogenität der Viren des SPBN-Stamm bei i.m. Inokulation. Weniger pathogene RV-Stämme exprimieren mehr RV-G was *in vitro* zu einer erhöhten Apoptoserate der infizierten Zellen führt [102, 120, 155]. Es konnte zudem durch den rekombinanten RV-Stamm SPBNGA-GA nachweis erbracht werden, dass eine direkte Korrelation zwischen der Expressionsrate von RV-G und dem Ausmaß der induzierten Apoptose besteht: Dieser RV-Stamm bewirkt durch das Vorhandensein zwei identischer Kopien der Glykoprotein-Gensequenz eine Überexpression derselben [49]. In der Regel wirkt sich die Apoptose infizierter Neurone positiv auf das Überleben des Wirts aus [85]. Auch für RV-Infektionen wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression des RV-G in Neuronen Apoptose induziert, wodurch die transsynaptische Virus-Ausbreitung behindert wird [49]. Es ist also für den Verlauf der Erkrankung entscheidend, welche Zellen von einer induzierten Apoptose betroffen sind.

Es wurde gezeigt, dass bei i.m. Infektion 100% der mit SPBN infizierten Tiere überleben [143]. Ebenso verhält es sich bei i.m. Infektion mit dem rekombinanten Rabies-Virus-Stamm SN-10, der ebenfalls aus dem Vakzinestamm SAD B19 generiert wurde [121]. Für SN-10 wurde ebenfalls eine Apoptoseinduktion in Neuronen des Rückenmarks festgestellt [155]. In Zusammenschau mit der RV-G-abhängigen Apoptoseinduktion kann nun angenommen werden, dass die spezifische Glykoproteinexpression SPBN sowie SN-10 bei peripherer Inokulation aufgrund einer Apoptoseinduktion daran hindert, das Gehirn zu erreichen. Vor allem T-Lymphozyten und Mikrogliazellen sterben durch Apoptose, Virus-infizierte Neurone hingegen eher durch Nekrose [89]. Die in unserem Modell fehlende T-Lymphozyten-Infiltration passt in diesem Sinne dazu, dass keine Apoptose beobachtet werden konnte.

Basierend auf unseren *in vivo* erhobenen Daten konnten wir die beschriebene negative Korrelation zwischen RV-G-Expressionsrate auf zellulärer Ebene und der Pathogenität eines RV-Stammes bezogen auf das Einsetzen klinischer Zeichen ei-

ner RV-Erkrankung nicht nachvollziehen. Die Quantifizierung auf zellulärer Ebene ergab, dass von mit SPBN infizierten Neuronen mehr RV-G exprimiert wird und gleichzeitig der Krankheitsprogress signifikant beschleunigt ist. Da wir keine Apoptosezeichen in diesen Neuronen finden konnten, nehmen wir an, dass diese positive Korrelation zwischen zellulärer RV-G-Expression und der schnelleren Krankheitsprogression darin begründet liegt, dass eine Überexpression von RV-G den Zellstoffwechsel stört, was wiederum zu einer kürzeren Lebenszeit der infizierten Tiere führt. Hinzu kommt, dass sich die Viren vom Stamm SPBN *in vitro* schneller replizieren als jene vom Stamm SPBN-DOG4 (unveröffentlichte Daten von Frau Mirjam Bertoune). Das Ausbleiben von Apoptose stimmt mit der Beobachtung an Menschen überein, bei deren RV-Erkrankung die Apoptose keine entscheidende Rolle spielt [81].

Bei Betrachtung der Expression von RV-G im gesamten Gehirn lässt sich allerdings eine positive Korrelation mit der mittleren Überlebenszeit sowie dem Ausmaß der Immunreaktionen nachweisen. Das RV-G des Stammes DOG4 gewährt, verglichen mit SPBN, ein höheres Maß an Neuroinvasivität, was sich in einer höheren Zahl infizierter Neurone und einer höheren Zahl genomischer Äquivalente wieder spiegelt. Da der Austausch der RV-G-Gensequenz im SPBN-Genom durch die von DOG4 zu einer Abnahme der zellulären RV-G-Expression führte, die Expression der Nukleoprotein (RV-N) mRNA und damit die Produktion von RNP nicht signifikant unterschiedlich zwischen den RV-Stämmen SPBN und SPBN-DOG4 waren, schließen wir daraus, dass die virale Gentranskriptionsrate nicht allein von intergenomischen Regionen abhängt [53], sondern dass vielmehr das RV-G-Gen selbst einen entscheidenden Einfluss auf seine Expression hat [155]. Eine unterschiedliche Empfindlichkeit für microRNA mag der zugrundeliegende Mechanismus dieses Phänomens sein, was Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein könnte. Die Restriktion der immunogenen RV-G-Expression kann als eine Strategie pathogener RV-Stämme angesehen werden, Immunreaktionen des Wirts zu umgehen. Deshalb sehen wir es als eine überraschende Entdeckung an, dass das RV-G des hochpathogenen RV-Stammes DOG4 mehr globale und lokale Immunreaktionen auslöst als

das des attenuierten Stammes SPBN und damit die Überlebenszeit von mit SPBN-DOG4 infizierten Tiere verlängert ist.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten unterstreichen die Wichtigkeit, zwischen der Expression von RV-Proteinen im gesamten Gehirn und in einzelnen Neuronen zu unterscheiden; dies konnten wir *in vivo* nachweisen. Die Ausbreitung der Viren, die zelluläre Glykoproteinexpression und die Aktivierung einer Immunantwort hängen von der Art des Glykoproteins ab. Des weiteren ist RV-G ein entscheidender Faktor für die Mikroglia-Aktivierung: Eine hohe zelluläre RV-G-Expression geht mit einer geringeren Mikroglia-Proliferation und einer gesteigerten Progression der Erkrankung einher. Die Aufdeckung der Mechanismen, die es dem Wirt erlauben, die virale Pathogenität zu attenuieren, können zur Entwicklung neuer Therapien für bei Rabies-Virus-Infektion führen.

7 Nachtrag: Überlegungen zur Therapie-Optimierung

Gemäß den vom Robert Koch-Institut (RKI) veröffentlichten Leitlinien ist bei einer Grad-III-Exposition (jegliche Bissverletzung oder Kratzwunden, Kontamination von Schleimhäuten mit Speichel durch ein tollwutverdächtiges oder tollwütiges Wild- oder Haustier) einer nicht vakzinierten Person folgendermaßen vorzugehen: Zuerst erfolgt ein gründliches Waschen und Ausbürsten der Biss- oder Kratzwunde mit Seifenlösung. Allein dadurch kann die Inzidenz der Erkrankung bereits um 65% gesenkt werden [19]. Es folgen aktive Immunisierung und einmalig simultan mit der ersten Impfung passive Immunisierung mit Rabies-Immunglobulin (20 IE/kg Körpergewicht). Ein übliches Schema sind Impfungen an den Tagen 0, 3, 7, 14, 28 nach der Exposition. Zudem sollte auch eine Tetanusprophylaxe erfolgen [152].

Ein großes Problem dieses Therapieschemas sind zum einen die Kosten. Die Durchführung einer Postexpositionsprophylaxe (PEP) gemäß diesem, vom RKI empfohlenen Schema kostet für eine Person rund 1000€ (siehe nachfolgende Rechnung, Tabelle 8). Die Kostenfrage ist insofern problematisch, als dass 99% aller durch Rabies verursachten menschlichen Todesfälle in Entwicklungsländern auftreten [188].

Erschwerend kommen dort oft auch noch logistische Probleme hinzu [88].

Medikament	Preis pro Einzeldosis	Applikationen
Berirab (Rabies Immunglobulin)	788,63 – 896,58€	1
Rabipur (Rabies Vakzine)	42,10 – 51,07€	5
Gesamtpreis	999,13 – 1151,93€	

Tabelle 8: Kostenberechnung für eine einzelne Rabies-Postexpositionsprophylaxe für eine zuvor nicht vakzinierte Person (Stand 27.2.2008 [93]).

Wie der Kostenaufstellung in Tabelle 8 zu entnehmen ist, machen die Kosten für das einmal verabreichte Immunglobulin rund 78% der Gesamtkosten der PEP aus. Eine kostengünstigere Alternative für das Immunglobulin zu entwickeln wäre aus humanitärer Sicht also hoch interessant.

Ein weiterer Nachteil der passiven Immunisierung ist das Interferenz-Phänomen. Dietzschold et al. konnten nachweisen, dass die RV-spezifische B-Zell-Antwort von Mäusen, denen monoklonale RV-Antikörper (mAb-C) injiziert wurden, dosisabhängig supprimiert wurde [161]. Ebenso existieren Fallberichte über menschliche Tollwutopfer, die zuvor eine Postexpositions-Prophylaxe erhalten hatten. Dies ist ebenso durch das Interferenz-Phänomen erklärbar: Durch das dabei verabreichte *heterologe* Immunglobulin wurde eine aktive Ausbildung eines suffizienten Antikörpertiters verhindert. Neuere *homologes* Rabies Immunglobulin menschlichen Ursprungs (Rabies Immune Globulin of Human Origin, RIGH) scheint diesen Effekt nicht hervorzurufen [92].

Neben der finanziellen Problematik ist denkbar, dass lange Anfahrtswege, wie diese v.a. in ländlichen Regionen vorzufinden sind, betroffene Personen davon abhalten, die für eine suffiziente Postexpositionsprophylaxe erforderlichen 5 Dosen Immunglobulin zu empfangen. Insofern wäre die Entwicklung einer PEP, die nur einmal verabreicht werden muss, hilfreich.

Ein von der Arbeitsgruppe Dietzschold entwickelter neuer Rabies-Vakzinestamm ist in dieser Hinsicht vielversprechend. Im Tiermodell ist dieser Vakzinestamm als PEP bei einmaliger Applikation und sogar nach Auftreten erster Symptome der RV-Infektion wirksam. Es handelt sich dabei um einen attenuierten RV-Stamm, dessen Genom 3 Kopien des Glykoproteins enthält. Aufgrund der dadurch vermehrten Glykoproteinexpression wird eine sehr viel stärkere Immunantwort ausgelöst [48]. Im Tiermodell ist dieser Vakzinestamm nicht tödlich und sowohl zur Pre- als auch zur Postexpositionsprophylaxe einsetzbar. Der auf Infektionskrankheiten spezialisierte Pädiater Rodney E. Willoughby, MD am Medical College of Wisconsin in Milwaukee, USA, sieht das große Potential dieser Vakzine, sofern für Menschen einsetzbar, in der Präexpositionsprophylaxe. Dadurch könnte die Immunisierung gegen Rabies in stark betroffenen Regionen wie Indien oder Afrika flächendeckend eingesetzt werden [18].

Um die Verbreitung der Tollwut einzudämmen, müssen auch Tiere vakziniert werden; so können bestehende Infektionsketten durchbrochen werden. Hierbei haben sich die Vakzinierung von wild lebenden Tieren durch Auslegen von Impfködern, aber auch die gezielte Vakzinierung von Haustieren als wirksam erwiesen [188]. Impfköder sind kostengünstig, ebenso die Präexpositionsprophylaxe, welche vom RKI für gefährdete Personen wie Förster oder Tierärzte empfohlen wird.

Groß angelegte Impfkaktionen, wenigstens für als Haustiere gehaltene Hunde haben sich in Tunesien als durchführbar und sinnvoll erwiesen, wie eine 1999 veröffentlichte Studie zeigte [162]. Abhängig vom Alter entwickelten 79-99% aller vakzinierten Tiere hinreichend hohe Immunglobulin-Titer und damit einen ausreichenden Schutz gegen die Infektion [162].

Auch die Weiterentwicklung von Vakzinen für Menschen sowie für Haus- und Wildtiere ist für die Prophylaxe und Eindämmung neuer RV-Stämme wichtig. Dazu sollten auch neue Erkenntnisse über den Einfluss der verschiedenen Virus-Komponenten auf das Pathogenitätsverhalten einbezogen werden. Impfstoffe, die aus deaktivierten Rabies-Viren bestehen, können zwar effektiv zur Immunisierung von Hunden eingesetzt werden, die Vakzinierung wild lebender Hunde ist damit

aber nicht durchführbar. Vielversprechend sind auch modifizierte Adenoviren, welche RV-G exprimieren und so als orale Wildtier-Vakzine Anwendung finden könnten [104]. Dennoch bleibt die Gefahr für Menschen, die mit solchen Impfködern in Kontakt kommen, bestehen [107, 153].

Wichtig ist zudem die Aufklärung der Bevölkerung, besonders in Risikogebieten wie Indien; denn dort suchen lediglich 60% der von Hunden gebissenen Menschen professionelle medizinische Hilfe. Dramatischerweise handelt es sich bei den Bissopfern besonders oft um Kinder [19]. Allerdings sind nicht nur Menschen in Entwicklungs- und Schwellenländern betroffen. Auch im US-Bundesstaat Georgia wurden im Zeitraum zwischen 1986 und 1995 40 Fälle menschlicher Tollwutopfer registriert. 93% davon waren auf Hundebisse zurückzuführen [75]. Aber auch Fledermäuse gewinnen in den USA als Vektoren an Bedeutung [115] (vgl. Abschnitt 2.1.3, „cryptic rabies“). Anhand von Fallberichten ist anzunehmen, dass die Bevölkerung auch in den USA über die Gefahr von Fledermausbissen und das entsprechende Vorgehen nach einem Bissereignis unzureichend aufgeklärt ist [168]. Es sind deshalb weltweite Aufklärungsaktionen bezüglich der von Wildtieren ausgehenden Infektionsgefahr, der Übertragungswege und der Wichtigkeit der Postexpositionsprophylaxe vonnöten; als Voraussetzung dafür muss diese beinahe schon vergessene Krankheit wieder ins öffentliche Bewusstsein gerückt werden [66].

8 Literatur

- [1] ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. ; PILLAI, S. : *Cellular and Molecular Immunology*. 6. Saunders / Elsevier, 2007. – 287 S.
- [2] ABBOTT, N. J.: Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. In: *J Anat* 200 (2002), Jun, Nr. 6, S. 629–638
- [3] AKWA, Y. ; HASSETT, D. E. ; ELORANTA, M. L. ; SANDBERG, K. ; MASLIAH, E. ; POWELL, H. ; WHITTON, J. L. ; BLOOM, F. E. ; CAMPBELL, I. L.: Transgenic expression of IFN-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. In: *J Immunol* 161 (1998), Nov, Nr. 9, S. 5016–5026
- [4] ALBERTINI, A. A. V. ; SCHOEHN, G. ; WEISSENHORN, W. ; RUIGROK, R. W. H.: Structural aspects of rabies virus replication. In: *Cell Mol Life Sci* 65 (2008), Jan, Nr. 2, 282–294. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-007-7298-1>. – DOI 10.1007/s00018-007-7298-1
- [5] ALOISI, F. ; RIA, F. ; ADORINI, L. : Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. In: *Immunol Today* 21 (2000), Mar, Nr. 3, S. 141–147
- [6] ALOISI, F. ; RIA, F. ; COLUMBA-CABEZAS, S. ; HESS, H. ; PENNA, G. ; ADORINI, L. : Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4⁺ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. In: *Eur J Immunol* 29 (1999), Sep, Nr. 9, S. 2705–2714

- [7] ALOISI, F. ; RIA, F. ; PENNA, G. ; ADORINI, L. : Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. In: *J Immunol* 160 (1998), May, Nr. 10, S. 4671–4680
- [8] ALOISI, F. ; SIMONE, R. D. ; COLUMBA-CABEZAS, S. ; PENNA, G. ; ADORINI, L. : Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. In: *J Immunol* 164 (2000), Feb, Nr. 4, S. 1705–1712
- [9] ASADULLAH, K. ; STERRY, W. ; VOLK, H. D.: Interleukin-10 therapy–review of a new approach. In: *Pharmacol Rev* 55 (2003), Jun, Nr. 2, 241–269. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.55.2.4> – DOI 10.1124/pr.55.2.4
- [10] AUPHAN, N. ; DiDONATO, J. A. ; ROSETTE, C. ; HELMBERG, A. ; KARIN, M. : Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. In: *Science* 270 (1995), Oct, Nr. 5234, S. 286–290
- [11] AYOUB, A. E. ; SALM, A. K.: Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. In: *J Neurosci* 23 (2003), Aug, Nr. 21, S. 7759–7766
- [12] BALOUL, L. ; LAFON, M. : Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. In: *Biochimie* 85 (2003), Aug, Nr. 8, S. 777–788
- [13] BANGKOK POST: *Dog Food. Vietnamese Canine Delicacies*. <http://www.corkscrew-balloon.com/00/08/3thai/19a.html>. Version: Feb 2010
- [14] BERG, D. J. ; KÜHN, R. ; RAJEWSKY, K. ; MÜLLER, W. ; MENON, S. ; DAVIDSON, N. ; GRÜNIG, G. ; RENNICK, D. : Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. In: *J Clin Invest* 96 (1995),

Nov, Nr. 5, 2339–2347. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118290>. – DOI 10.1172/JCI118290

- [15] BIGNAMI, A. ; ENG, L. F. ; DAHL, D. ; UYEDA, C. T.: Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. In: *Brain Res* 43 (1972), Aug, Nr. 2, S. 429–435
- [16] BLOMGREN, K. ; ZHU, C. ; WANG, X. ; KARLSSON, J. O. ; LEVERIN, A. L. ; BAHR, B. A. ; MALLARD, C. ; HAGBERG, H. : Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of „pathological apoptosis“? In: *J Biol Chem* 276 (2001), Mar, Nr. 13, 10191–10198. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007807200>. – DOI 10.1074/jbc.M007807200
- [17] BOURHY, H. ; ROLLIN, P. E. ; VINCENT, J. ; SUREAU, P. : Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. In: *J Clin Microbiol* 27 (1989), Mar, Nr. 3, S. 519–523
- [18] BUCHEN, L. : *A knockout vaccine for rabies?* Nature News. <http://dx.doi.org/10.1038/news.2009.627>. Version: July 2009
- [19] BURKI, T. : The global fight against rabies. In: *Lancet* 372 (2008), Sep, Nr. 9644, S. 1135–1136
- [20] CAMPBELL, I. L. ; ABRAHAM, C. R. ; MASLIAH, E. ; KEMPER, P. ; INGLIS, J. D. ; OLDSTONE, M. B. ; MUCKE, L. : Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), Nov, Nr. 21, S. 10061–10065
- [21] CARRITHERS, M. D. ; VISINTIN, I. ; KANG, S. J. ; JANEWAY, C. A.: Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. In: *Brain* 123 (Pt 6) (2000), Jun, S. 1092–1101

- [22] CARTER, J. ; SAUNDERS, V. : *Virology: Principles and Applications*. 1. Auflage. Wiley, 2007. – ISBN: 0470023872
- [23] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): Recovery of a patient from clinical rabies–Wisconsin, 2004. In: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53 (2004), Dec, Nr. 50, 1171–1173. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5350a1.htm>
- [24] CHAPMAN, G. A. ; MOORES, K. ; HARRISON, D. ; CAMPBELL, C. A. ; STEWART, B. R. ; STRIJBOS, P. J.: Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. In: *J Neurosci* 20 (2000), Aug, Nr. 15, S. RC87
- [25] CHHABRA, M. ; BHARDWAJ, M. ; ICHHPUJANI, R. L. ; LAL, S. : Comparative evaluation of commonly used laboratory tests for post-mortem diagnosis of rabies. In: *Indian J Pathol Microbiol* 48 (2005), Apr, Nr. 2, S. 190–193
- [26] CHU, C. Q. ; WITTMER, S. ; DALTON, D. K.: Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *J Exp Med* 192 (2000), Jul, Nr. 1, S. 123–128
- [27] CONZELMANN, K. K. ; COX, J. H. ; SCHNEIDER, L. G. ; THIEL, H. J.: Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. In: *Virology* 175 (1990), Apr, Nr. 2, S. 485–499
- [28] CORBIN, J. G. ; KELLY, D. ; RATH, E. M. ; BAERWALD, K. D. ; SUZUKI, K. ; POPKO, B. : Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice leads to hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. In: *Mol Cell Neurosci* 7 (1996), May, Nr. 5, 354–370. <http://dx.doi.org/10.1006/mcne.1996.0026>. – DOI 10.1006/mcne.1996.0026

- [29] COX, J. H. ; DIETZSCHOLD, B. ; SCHNEIDER, L. G.: Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. In: *Infect Immun* 16 (1977), Jun, Nr. 3, S. 754–759
- [30] CURRAN, J. ; MARQ, J. B. ; KOLAKOSKY, D. : An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. In: *J Virol* 69 (1995), Feb, Nr. 2, S. 849–855
- [31] D'ANDREA, A. ; ASTE-AMEZAGA, M. ; VALIANTE, N. M. ; MA, X. ; KUBIN, M. ; TRINCHIERI, G. : Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. In: *J Exp Med* 178 (1993), Sep, Nr. 3, S. 1041–1048
- [32] DICKSON, D. W. ; MATTIACE, L. A. ; KURE, K. ; HUTCHINS, K. ; LYMAN, W. D. ; BROSNAN, C. F.: Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. In: *Lab Invest* 64 (1991), Feb, Nr. 2, S. 135–156
- [33] DIETZSCHOLD, B. : Antibody-mediated clearance of viruses from the mammalian central nervous system. In: *Trends Microbiol* 1 (1993), May, Nr. 2, S. 63–66
- [34] DIETZSCHOLD, B. ; KAO, M. ; ZHENG, Y. M. ; CHEN, Z. Y. ; MAUL, G. ; FU, Z. F. ; RUPPRECHT, C. E. ; KOPROWSKI, H. : Delineation of putative mechanisms involved in antibody-mediated clearance of rabies virus from the central nervous system. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Aug, Nr. 15, S. 7252–7256
- [35] DIETZSCHOLD, B. ; MORIMOTO, K. ; HOOPER, D. C. ; SMITH, J. S. ; RUPPRECHT, C. E. ; KOPROWSKI, H. : Genotypic and phenotypic diversity of rabies virus variants involved in human rabies: implications for postexposure prophylaxis. In: *J Hum Virol* 3 (2000), Nr. 1, S. 50–57

- [36] DIETZSCHOLD, B. ; SCHNELL, M. ; KOPROWSKI, H. : Pathogenesis of rabies. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 292 (2005), S. 45–56
- [37] DIETZSCHOLD, B. ; TOLLIS, M. ; LAFON, M. ; WUNNER, W. H. ; KOPROWSKI, H. : Mechanisms of rabies virus neutralization by glycoprotein-specific monoclonal antibodies. In: *Virology* 161 (1987), Nov, Nr. 1, S. 29–36
- [38] DIETZSCHOLD, B. ; WIKTOR, T. J. ; MACFARLAN, R. ; VARRICHIO, A. : Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. In: *J Virol* 44 (1982), Nov, Nr. 2, S. 595–602
- [39] DIETZSCHOLD, B. ; WIKTOR, T. J. ; TROJANOWSKI, J. Q. ; MACFARLAN, R. I. ; WUNNER, W. H. ; TORRES-ANJEL, M. J. ; KOPROWSKI, H. : Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. In: *J Virol* 56 (1985), Oct, Nr. 1, S. 12–18
- [40] DIETZSCHOLD, B. ; WUNNER, W. H. ; WIKTOR, T. J. ; LOPES, A. D. ; LAFON, M. ; SMITH, C. L. ; KOPROWSKI, H. : Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983), Jan, Nr. 1, S. 70–74
- [41] DIMMOCK, N. J. ; EASTON, A. J. ; LEPPARD, K. N.: *Introduction to Modern Virology*. 5. Blackwell Science, Ltd., 2001. – ISBN: 0-632-05509-X. – ISBN: 0-632-05509-X
- [42] DONG, Y. ; BENVENISTE, E. N.: Immune function of astrocytes. In: *Glia* 36 (2001), Nov, Nr. 2, S. 180–190
- [43] DRÖSSLER, K. ; GEMSA, D. : *Wörterbuch der Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage 2000
- [44] EGWUAGU, C. E. ; SZTEIN, J. ; CHAN, C. C. ; MAHDI, R. ; NUSSENBLATT, R. B. ; CHEPELINSKY, A. B.: gamma Interferon expression disrupts lens and retinal differentiation in transgenic mice. In: *Dev Biol* 166 (1994), Dec,

Nr. 2, 557–568. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1994.1337>. – DOI 10.1006/dbio.1994.1337

- [45] ENG, L. F. ; VANDERHAEGHEN, J. J. ; BIGNAMI, A. ; GERSTL, B. : An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. In: *Brain Res* 28 (1971), May, Nr. 2, S. 351–354
- [46] ERLANDSSON, L. ; BLUMENTHAL, R. ; ELORANTA, M. L. ; ENGEL, H. ; ALM, G. ; WEISS, S. ; LEANDERSON, T. : Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. In: *Curr Biol* 8 (1998), Feb, Nr. 4, S. 223–226
- [47] FABER, M. ; BETTE, M. ; PREUSS, M. A. R. ; PULMANAUSAHAKUL, R. ; REHNELT, J. ; SCHNELL, M. J. ; DIETZSCHOLD, B. ; WEIHE, E. : Overexpression of tumor necrosis factor alpha by a recombinant rabies virus attenuates replication in neurons and prevents lethal infection in mice. In: *J Virol* 79 (2005), Dec, Nr. 24, 15405–15416. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.24.15405-15416.2005>. – DOI 10.1128/JVI.79.24.15405–15416.2005
- [48] FABER, M. ; LI, J. ; KEAN, R. B. ; HOOPER, D. C. ; ALUGUPALLI, K. R. ; DIETZSCHOLD, B. : Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Jul, Nr. 27, 11300–11305. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905640106>. – DOI 10.1073/pnas.0905640106
- [49] FABER, M. ; PULMANAUSAHAKUL, R. ; HODAWADEKAR, S. S. ; SPITSIN, S. ; MCGETTIGAN, J. P. ; SCHNELL, M. J. ; DIETZSCHOLD, B. : Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. In: *J Virol* 76 (2002), Apr, Nr. 7, S. 3374–3381
- [50] FABER, M. ; PULMANAUSAHAKUL, R. ; NAGAO, K. ; PROSNIAK, M. ; RICE, A. B. ; KOPROWSKI, H. ; SCHNELL, M. J. ; DIETZSCHOLD, B. :

- Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Nov, Nr. 46, 16328–16332. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407289101>. – DOI 10.1073/pnas.0407289101
- [51] FATTORI, E. ; LAZZARO, D. ; MUSIANI, P. ; MODESTI, A. ; ALONZI, T. ; CILIBERTO, G. : IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrogliosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. In: *Eur J Neurosci* 7 (1995), Dec, Nr. 12, S. 2441–2449
- [52] FERRARO, E. ; CECCONI, F. : Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. In: *Arch Biochem Biophys* 462 (2007), Jun, Nr. 2, 210–219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.006>. – DOI 10.1016/j.abb.2007.02.006
- [53] FINKE, S. ; COX, J. H. ; CONZELMANN, K. K.: Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. In: *J Virol* 74 (2000), Aug, Nr. 16, S. 7261–7269
- [54] FOLEY, H. D. ; MCGETTIGAN, J. P. ; SILER, C. A. ; DIETZSCHOLD, B. ; SCHNELL, M. J.: A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Dec, Nr. 26, 14680–14685. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.011510698>. – DOI 10.1073/pnas.011510698
- [55] FREI, K. ; SIEPL, C. ; GROSCURTH, P. ; BODMER, S. ; SCHWERDEL, C. ; FONTANA, A. : Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. In: *Eur J Immunol* 17 (1987), Sep, Nr. 9, S. 1271–1278
- [56] FU, Z. F. ; WEIHE, E. ; ZHENG, Y. M. ; SCHÄFER, M. K. ; SHENG, H. ; CORISDEO, S. ; RAUSCHER, F. J. ; KOPROWSKI, H. ; DIETZSCHOLD, B. : Differential effects of rabies and borna disease viruses on immediate-early-

- and late-response gene expression in brain tissues. In: *J Virol* 67 (1993), Nov, Nr. 11, S. 6674–6681
- [57] GIBBONS, R. V.: Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. In: *Ann Emerg Med* 39 (2002), May, Nr. 5, S. 528–536
- [58] GOLDSTEIN, G. W.: Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. In: *Ann N Y Acad Sci* 529 (1988), S. 31–39
- [59] GRIFFIN, D. E.: Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. In: *Nat Rev Immunol* 3 (2003), Jun, Nr. 6, 493–502. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1105>. – DOI 10.1038/nri1105
- [60] GRÜTZ, G. : New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. In: *J Leukoc Biol* 77 (2005), Jan, Nr. 1, 3–15. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0904484>. – DOI 10.1189/jlb.0904484
- [61] HANLON, C. A. ; KUZMIN, I. V. ; BLANTON, J. D. ; WELDON, W. C. ; MANANGAN, J. S. ; RUPPRECHT, C. E.: Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. In: *Virus Res* 111 (2005), Jul, Nr. 1, 44–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.009>. – DOI 10.1016/j.virusres.2005.03.009
- [62] HARMON, S. A. ; ROBINSON, E. N. ; SUMMERS, D. F.: Ultrastructural localization of L and NS enzyme subunits on vesicular stomatitis virus RNPs using gold sphere-staphylococcal protein A-monospecific IgG conjugates. In: *Virology* 142 (1985), Apr, Nr. 2, S. 406–410
- [63] HARRISON, J. K. ; JIANG, Y. ; CHEN, S. ; XIA, Y. ; MACIEJEWSKI, D. ; MCNAMARA, R. K. ; STREIT, W. J. ; SALAFRANCA, M. N. ; ADHIKARI, S. ; THOMPSON, D. A. ; BOTTI, P. ; BACON, K. B. ; FENG, L. : Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Sep, Nr. 18, S. 10896–10901

- [64] HEMACHUDHA, T. ; LAOTHAMATAS, J. ; RUPPRECHT, C. E.: Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. In: *Lancet Neurol* 1 (2002), Jun, Nr. 2, S. 101–109
- [65] HEMACHUDHA, T. ; SUNSANEEWITAYAKUL, B. ; DESUDCHIT, T. ; SUAN-KRATAY, C. ; SITTIPUNT, C. ; WACHARAPLUESADEE, S. ; KHAWPLOD, P. ; WILDE, H. ; JACKSON, A. C.: Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies. In: *J Neurovirol* 12 (2006), Oct, Nr. 5, 407–409. <http://dx.doi.org/10.1080/13550280600902295>. – DOI 10.1080/13550280600902295
- [66] HEUDORF, U. : Tollwut – eine schon fast vergessene Krankheit, aber ein aktuelles Problem. In: *Hessisches Ärzteblatt* 12 (2004), S. 698–699
- [67] HICKEY, W. F. ; HSU, B. L. ; KIMURA, H. : T-lymphocyte entry into the central nervous system. In: *J Neurosci Res* 28 (1991), Feb, Nr. 2, 254–260. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.490280213>. – DOI 10.1002/jnr.490280213
- [68] HIROTA, H. ; KIYAMA, H. ; KISHIMOTO, T. ; TAGA, T. : Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. In: *J Exp Med* 183 (1996), Jun, Nr. 6, S. 2627–2634
- [69] HOOPER, D. C. ; SAUDER, C. ; SCOTT, G. S. ; DIETZSCHOLD, B. ; RICHT, J. A.: Immunopathology and immunoprotection in CNS virus infections: mechanisms of virus clearance from the CNS. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 265 (2002), S. 163–182
- [70] HOOPER, D. C. ; MORIMOTO, K. ; BETTE, M. ; WEIHE, E. ; KOPROWSKI, H. ; DIETZSCHOLD, B. : Collaboration of Antibody and Inflammation in Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. In: *J Virol* 72 (1998), Nr. 5, 3711–3719. <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/72/5/3711>

- [71] HORIKAMI, S. M. ; CURRAN, J. ; KOLAKOFSKY, D. ; MOYER, S. A.: Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. In: *J Virol* 66 (1992), Aug, Nr. 8, S. 4901–4908
- [72] HSU, S. M. ; SOBAN, E. : Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. In: *J Histochem Cytochem* 30 (1982), Oct, Nr. 10, S. 1079–1082
- [73] HU, B. R. ; LIU, C. L. ; OUYANG, Y. ; BLOMGREN, K. ; SIESJÖ, B. K.: Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (2000), Sep, Nr. 9, 1294–1300. <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-200009000-00003>. – DOI 10.1097/00004647-200009000-00003
- [74] HUANG, Y. M. ; HUSSIEN, Y. ; YARILIN, D. ; XIAO, B. G. ; LIU, Y. J. ; LINK, H. : Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells. In: *Cytokine* 13 (2001), Mar, Nr. 5, 264–271. <http://dx.doi.org/10.1006/cyto.2000.0835>. – DOI 10.1006/cyto.2000.0835
- [75] IMNADZE, P. ; SURGULADZE, V. ; TUSHISHVILI, T. ; BAIDOSHVILI, L. : Rabies control and prevention in Georgia: current status and perspectives. In: *Dev Biol (Basel)* 131 (2008), S. 387–391
- [76] IRANI, D. N. ; GRIFFIN, D. E.: Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. In: *J Immunol* 156 (1996), May, Nr. 10, S. 3850–3857
- [77] ITO, N. ; TAKAYAMA, M. ; YAMADA, K. ; SUGIYAMA, M. ; MINAMOTO, N. : Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. In: *J Virol* 75 (2001), Oct, Nr. 19, 9121–9128. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.19.9121-9128.2001>. – DOI 10.1128/JVI.75.19.9121–9128.2001

- [78] JACKSON, A. C. ; ROSSITER, J. P.: Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. In: *J Virol* 71 (1997), Jul, Nr. 7, S. 5603–5607
- [79] JACKSON, A. C.: Recovery from rabies. In: *N Engl J Med* 352 (2005), Jun, Nr. 24, 2549–2550. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMe058092>. – DOI 10.1056/NEJMe058092
- [80] JACKSON, A. C.: Rabies: new insights into pathogenesis and treatment. In: *Curr Opin Neurol* 19 (2006), Jun, Nr. 3, 267–270. <http://dx.doi.org/10.1097/01.wco.0000227036.93199.3b>. – DOI 10.1097/01.wco.0000227036.93199.3b
- [81] JACKSON, A. C. ; RANDLE, E. ; LAWRENCE, G. ; ROSSITER, J. P.: Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. In: *J Neurovirol* 14 (2008), Oct, Nr. 5, 368–375. <http://dx.doi.org/10.1080/13550280802216502>. – DOI 10.1080/13550280802216502
- [82] JACKSON, A. C. ; WARRELL, M. J. ; RUPPRECHT, C. E. ; ERTL, H. C. J. ; DIETZSCHOLD, B. ; O'REILLY, M. ; LEACH, R. P. ; FU, Z. F. ; WUNNER, W. H. ; BLECK, T. P. ; WILDE, H. : Management of rabies in humans. In: *Clin Infect Dis* 36 (2003), Jan, Nr. 1, S. 60–63
- [83] JEBBARI, H. ; ROBERTS, C. W. ; FERGUSON, D. J. ; BLUETHMANN, H. ; ALEXANDER, J. : A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. In: *Parasite Immunol* 20 (1998), May, Nr. 5, S. 231–239
- [84] JOGAI, S. ; RADOTRA, B. D. ; BANERJEE, A. K.: Rabies viral antigen in extracranial organs: a post-mortem study. In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 28 (2002), Aug, Nr. 4, S. 334–338
- [85] KAMINSKY, V. ; ZHIVOTOVSKY, B. : To kill or be killed: how viruses interact with the cell death machinery. In: *J Intern Med* 267 (2010), May, Nr.

- 5, 473–482. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02222.x>.
x. – DOI 10.1111/j.1365-2796.2010.02222.x
- [86] KLEIN, M. A. ; MÖLLER, J. C. ; JONES, L. L. ; BLUETHMANN, H. ; KREUTZBERG, G. W. ; RAIVICH, G. : Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. In: *Glia* 19 (1997), Mar, Nr. 3, S. 227–233
- [87] KNIPE, D. M. (Hrsg.) ; HOWLEY, P. M. (Hrsg.): *Fields Virology*. Bd. 1. Auflage 4. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – ISBN 0-7817-1832-5. – ISBN: 0-7817-1832-5
- [88] KNOBEL, D. L. ; CLEAVELAND, S. ; COLEMAN, P. G. ; FÈVRE, E. M. ; MELTZER, M. I. ; MIRANDA, M. E. G. ; SHAW, A. ; ZINSSTAG, J. ; MESLIN, F.-X. : Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. In: *Bull World Health Organ* 83 (2005), May, Nr. 5, 360–368. <http://dx.doi.org/S0042-96862005000500012>. – DOI /S0042-96862005000500012
- [89] KOJIMA, D. ; PARK, C.-H. ; SATOH, Y. ; INOUE, S. ; NOGUCHI, A. ; OYAMADA, T. : Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). In: *J Vet Med Sci* 71 (2009), Mar, Nr. 3, S. 319–324
- [90] KRAKOWSKI, M. ; OWENS, T. : Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. In: *Eur J Immunol* 26 (1996), Jul, Nr. 7, S. 1641–1646
- [91] KUSNE, S. ; SMILACK, J. : Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. In: *Liver Transpl* 11 (2005), Oct, Nr. 10, 1295–1297. <http://dx.doi.org/10.1002/lt.20580>. – DOI 10.1002/lt.20580
- [92] KUWERT, E. K.: [Passive immunization against rabies (author's transl)]. In: *Immun Infekt* 6 (1978), Apr, Nr. 2, S. 53–61
- [93] KWP-CONSULT: *Medikamente im Preisvergleich, ein Online-Angebot von KWP-Consult, Kirsch, Schröder & Partner. Der Preisvergleich für Medika-*

mente und Arzneimittel wird betrieben von: TDV-Data GmbH, Rosenstr. 25, 38685 Langelshelm. <http://www.kwp-consult.de/preisvergleich/>. <http://www.kwp-consult.de/preisvergleich/>. Version: Feb 2008, Abruf: 27.02.2008

- [94] KÜHN, R. ; LÖHLER, J. ; RENNICK, D. ; RAJEWSKY, K. ; MÜLLER, W. : Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. In: *Cell* 75 (1993), Oct, Nr. 2, S. 263–274
- [95] LAFAY, F. ; COULON, P. ; ASTIC, L. ; SAUCIER, D. ; RICHE, D. ; HOLLEY, A. ; FLAMAND, A. : Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. In: *Virology* 183 (1991), Jul, Nr. 1, S. 320–330
- [96] LAFON, M. : Subversive neuroinvasive strategy of rabies virus. In: *Arch Virol Suppl* (2004), Nr. 18, S. 149–159
- [97] LAFON, M. : Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 289 (2005), S. 239–258
- [98] LAFON, M. : Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. In: *Dev Biol (Basel)* 131 (2008), S. 413–419
- [99] LAMBERTSEN, K. L. ; CLAUSEN, B. H. ; BABCOCK, A. A. ; GREGERSEN, R. ; FENGER, C. ; NIELSEN, H. H. ; HAUGAARD, L. S. ; WIRENFELDT, M. ; NIELSEN, M. ; DAGNAES-HANSEN, F. ; BLUETHMANN, H. ; FAERGEMAN, N. J. ; MELDGAARD, M. ; DEIERBORG, T. ; FINSSEN, B. : Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. In: *J Neurosci* 29 (2009), Feb, Nr. 5, 1319–1330. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5505-08.2009>. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.5505-08.2009
- [100] LANG, K. S. ; NAVARINI, A. A. ; RECHER, M. ; LANG, P. A. ; HEIKENWALDER, M. ; STECHER, B. ; BERGTHALER, A. ; ODERMATT, B. ; AKIRA, S. ; HONDA, K. ; HENGARTNER, H. ; ZINKERNAGEL, R. M.: MyD88

- protects from lethal encephalitis during infection with vesicular stomatitis virus. In: *Eur J Immunol* 37 (2007), Sep, Nr. 9, 2434–2440. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737310>. – DOI 10.1002/eji.200737310
- [101] LAUREN SOMPAYRAC, P. : *How the Immune System works*. 1. Blackwell Science, Inc., 1999. – 57–59 S. – ISBN 0–632–04413–6. – ISBN: 0-632-04413-6
- [102] LAY, S. ; PRÉHAUD, C. ; DIETZSCHOLD, B. ; LAFON, M. : Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a major inducer of apoptosis in human jurkat T cells. In: *Ann N Y Acad Sci* 1010 (2003), Dec, S. 577–581
- [103] LENTZ, T. L. ; BURRAGE, T. G. ; SMITH, A. L. ; CRICK, J. ; TIGNOR, G. H. : Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? In: *Science* 215 (1982), Jan, Nr. 4529, S. 182–184
- [104] LI, J. ; FABER, M. ; PAPANERI, A. ; FABER, M.-L. ; MCGETTIGAN, J. P. ; SCHNELL, M. J. ; DIETZSCHOLD, B. : A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. In: *Virology* 356 (2006), Nr. 1-2, 147–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.037>. – DOI 10.1016/j.virol.2006.07.037
- [105] LODDICK, S. A. ; TURNBULL, A. V. ; ROTHWELL, N. J. : Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (1998), Feb, Nr. 2, 176–179. <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-199802000-00008>. – DOI 10.1097/00004647-199802000-00008
- [106] MACK, C. L. ; VANDERLUGT-CASTANEDA, C. L. ; NEVILLE, K. L. ; MILLER, S. D. : Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. In: *J Neuroimmunol* 144 (2003), Nov, Nr. 1-2, S. 68–79

- [107] MAURER, W. ; GUBER, S. E.: Rabies vaccination of foxes: vaccine residues as potential biohazardous waste. In: *Pediatr Infect Dis J* 20 (2001), Dec, Nr. 12, S. 1184–1185
- [108] MCGETTIGAN, J. P. ; POMERANTZ, R. J. ; SILER, C. A. ; MCKENNA, P. M. ; FOLEY, H. D. ; DIETZSCHOLD, B. ; SCHNELL, M. J.: Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. In: *J Virol* 77 (2003), Jan, Nr. 1, S. 237–244
- [109] MCKIMMIE, C. S. ; JOHNSON, N. ; FOOKS, A. R. ; LOCAL, J. K. F.: Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system. In: *Biochem Biophys Res Commun* 336 (2005), Oct, Nr. 3, 925–933. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.209>. – DOI 10.1016/j.bbrc.2005.08.209
- [110] MCLAURIN, J. ; ANTEL, J. P. ; YONG, V. W.: Immune and non-immune actions of interferon-beta-1b on primary human neural cells. In: *Mult Scler* 1 (1995), Apr, Nr. 1, S. 10–19
- [111] MEBATSION, T. : Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. In: *J Virol* 75 (2001), Dec, Nr. 23, 11496–11502. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.23.11496-11502.2001>. – DOI 10.1128/JVI.75.23.11496–11502.2001
- [112] MEBATSION, T. ; KONIG, M. ; CONZELMANN, K. K.: Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. In: *Cell* 84 (1996), Mar, Nr. 6, S. 941–951
- [113] MEBATSION, T. ; WEILAND, F. ; CONZELMANN, K. K.: Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. In: *J Virol* 73 (1999), Jan, Nr. 1, S. 242–250

- [114] MEGID, J. ; KANENO, R. ; NOZAKI, C. N. ; BRITO, C. J. C. ; ALMEIDA, M. F.: Increased interleukin-10 associated with low IL-6 concentration correlated with greater survival rates in mice infected by rabies virus vaccinated against it and immunomodulated with *P. acnes*. In: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27 (2004), Nov, Nr. 6, 393–411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.01.002>. – DOI 10.1016/j.cimid.2004.01.002
- [115] MESSENGER, S. L. ; SMITH, J. S. ; RUPPRECHT, C. E.: Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. In: *Clin Infect Dis* 35 (2002), Sep, Nr. 6, 738–747. <http://dx.doi.org/10.1086/342387>. – DOI 10.1086/342387
- [116] MESSERSMITH, D. J. ; MURTIE, J. C. ; LE, T. Q. ; FROST, E. E. ; ARMSTRONG, R. C.: Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination. In: *J Neurosci Res* 62 (2000), Oct, Nr. 2, S. 241–256
- [117] MIYAKE, T. ; OKADA, M. ; KITAMURA, T. : Reactive proliferation of astrocytes studied by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. In: *Brain Res* 590 (1992), Sep, Nr. 1-2, S. 300–302
- [118] MOORE, K. W. ; O’GARRA, A. ; WAAL MALEFYT, R. de ; VIEIRA, P. ; MOSMANN, T. R.: Interleukin-10. In: *Annu Rev Immunol* 11 (1993), 165–190. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001121>. – DOI 10.1146/annurev.iy.11.040193.001121
- [119] MORI, I. ; NISHIYAMA, Y. ; YOKOCHI, T. ; KIMURA, Y. : Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. In: *Rev Med Virol* 14 (2004), Nr. 4, 209–216. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.426>. – DOI 10.1002/rmv.426
- [120] MORIMOTO, K. ; HOOPER, D. C. ; SPITSIN, S. ; KOPROWSKI, H. ; DIETZSCHOLD, B. : Pathogenicity of different rabies virus variants inversely cor-

- relates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. In: *J Virol* 73 (1999), Jan, Nr. 1, S. 510–518
- [121] MORIMOTO, K. ; MCGETTIGAN, J. P. ; FOLEY, H. D. ; HOOPER, D. C. ; DIETZSCHOLD, B. ; SCHNELL, M. J.: Genetic engineering of live rabies vaccines. In: *Vaccine* 19 (2001), May, Nr. 25-26, S. 3543–3551
- [122] MORRIS, C. S. ; ESIRI, M. M. ; SPRINKLE, T. J. ; GREGSON, N. : Oligodendrocyte reactions and cell proliferation markers in human demyelinating diseases. In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 20 (1994), Jun, Nr. 3, S. 272–281
- [123] MOSMANN, T. R. ; SAD, S. : The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. In: *Immunol Today* 17 (1996), Mar, Nr. 3, S. 138–146
- [124] NADIN-DAVIS, S. A. ; FEHLNER-GARDINER, C. : Lyssaviruses: current trends. In: *Adv Virus Res* 71 (2008), 207–250. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00005-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00005-5). – DOI 10.1016/S0065-3527(08)00005-5
- [125] NEUMANN, H. : Control of glial immune function by neurons. In: *Glia* 36 (2001), Nov, Nr. 2, S. 191–199
- [126] NEUMANN, H. ; SCHMIDT, H. ; WILHARM, E. ; BEHRENS, L. ; WEKERLE, H. : Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. In: *J Exp Med* 186 (1997), Dec, Nr. 12, S. 2023–2031
- [127] NEUROSCIENCE ASSOCIATES: *Perfusion Protocol*. <http://www.neuroscienceassociates.com/perf-protocol.html>. <http://www.neuroscienceassociates.com/perf-protocol.html>. Version: 2006, Abruf: 14.11.2006
- [128] NORTON, W. T.: Cell reactions following acute brain injury: a review. In: *Neurochem Res* 24 (1999), Feb, Nr. 2, S. 213–218
- [129] OVANESOV, M. V. ; AYHAN, Y. ; WOLBERT, C. ; MOLDOVAN, K. ; SAUNDER, C. ; PLETNIKOV, M. V.: Astrocytes play a key role in activation of

- microglia by persistent Borna disease virus infection. In: *J Neuroinflammation* 5 (2008), 50. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-5-50>. – DOI 10.1186/1742-2094-5-50
- [130] OVANESOV, M. V. ; SAUDER, C. ; RUBIN, S. A. ; RICHT, J. ; NATH, A. ; CARBONE, K. M. ; PLETNIKOV, M. V.: Activation of microglia by bor-na disease virus infection: in vitro study. In: *J Virol* 80 (2006), Dec, Nr. 24, 12141–12148. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01648-06>. – DOI 10.1128/JVI.01648-06
- [131] OWENS, T. ; RENNO, T. ; TAUPIN, V. ; KRAKOWSKI, M. : Inflammatory cytokines in the brain: does the CNS shape immune responses? In: *Immunol Today* 15 (1994), Dec, Nr. 12, S. 566–571
- [132] PACOCHA, S. E. ; ORIENTE, A. ; LICHTENSTEIN, L. M. ; HUANG, S. K. ; ESSAYAN, D. M.: Interferon-beta induces selective enhancement of antigen-specific T cell responses. In: *J Interferon Cytokine Res* 20 (2000), Apr, Nr. 4, 383–389. <http://dx.doi.org/10.1089/107999000312324>. – DOI 10.1089/107999000312324
- [133] PAXINOUS, G. ; FRANKLIN, K. B. J.: *The Mouse Brain*. 2. Academic Press, 2001. – ISBN: 0-12-547636-1
- [134] PENKOWA, M. ; MOOS, T. ; CARRASCO, J. ; HADBERG, H. ; MOLINERO, A. ; BLUETHMANN, H. ; HIDALGO, J. : Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. In: *Glia* 25 (1999), Feb, Nr. 4, S. 343–357
- [135] PERRY, L. L. ; LODMELL, D. L.: Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine resistance to street rabies virus. In: *J Virol* 65 (1991), Jul, Nr. 7, S. 3429–3434
- [136] PFRIEGER, F. W. ; BARRES, B. A.: New views on synapse-glia interactions. In: *Curr Opin Neurobiol* 6 (1996), Oct, Nr. 5, S. 615–621

- [137] PFRIEGER, F. W. ; BARRES, B. A.: Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. In: *Science* 277 (1997), Sep, Nr. 5332, S. 1684–1687
- [138] PHARES, T. W. ; KEAN, R. B. ; MIKHEEVA, T. ; HOOPER, D. C.: Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. In: *J Immunol* 176 (2006), Jun, Nr. 12, S. 7666–7675
- [139] PORTER, J. T. ; MCCARTHY, K. D.: Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. In: *Prog Neurobiol* 51 (1997), Mar, Nr. 4, S. 439–455
- [140] PRINGLE, C. R.: The order Mononegavirales—current status. In: *Arch Virol* 142 (1997), Nr. 11, S. 2321–2326
- [141] PROMED-MAIL: *Treatment of cases of human rabies in Floresta Pernambuco*. http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1001:::NO::F2400_P1001_BACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000%2C74771. Version: Nov 2008. – Archiv-Nr: 20081114.3599
- [142] PULERA, M. R. ; ADAMS, L. M. ; LIU, H. ; SANTOS, D. G. ; NISHIMURA, R. N. ; YANG, F. ; COLE, G. M. ; WASTERLAIN, C. G.: Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. In: *Stroke* 29 (1998), Dec, Nr. 12, S. 2622–2630
- [143] PULMANAUSAHAKUL, R. ; FABER, M. ; MORIMOTO, K. ; SPITSIN, S. ; WEIHE, E. ; HOOPER, D. C. ; SCHNELL, M. J. ; DIETZSCHOLD, B. : Overexpression of cytochrome C by a recombinant rabies virus attenuates pathogenicity and enhances antiviral immunity. In: *J Virol* 75 (2001), Nov, Nr. 22, 10800–10807. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.22.10800-10807.2001>. – DOI 10.1128/JVI.75.22.10800–10807.2001
- [144] PULMANAUSAHAKUL, R. ; LI, J. ; SCHNELL, M. J. ; DIETZSCHOLD, B. : The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. In: *J Virol*

82 (2008), Mar, Nr. 5, 2330–2338. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02327-07>. – DOI 10.1128/JVI.02327-07

- [145] QIN, H. ; WILSON, C. A. ; ROBERTS, K. L. ; BAKER, B. J. ; ZHAO, X. ; BENVENISTE, E. N.: IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced CD40 gene expression through induction of suppressor of cytokine signaling-3. In: *J Immunol* 177 (2006), Dec, Nr. 11, S. 7761–7771
- [146] RAO, A. S. ; VARMA, D. R. ; RAO, M. V. C. ; MOHANDAS, S. : Case Report: Magnetic resonance imaging in rabies encephalitis. In: *Indian J Radiol Imaging* 19 (2009), Nr. 4, 301–304. <http://dx.doi.org/10.4103/0971-3026.57214>. – DOI 10.4103/0971-3026.57214
- [147] RAPPERT, A. ; BIBER, K. ; NOLTE, C. ; LIPP, M. ; SCHUBEL, A. ; LU, B. ; GERARD, N. P. ; GERARD, C. ; BODDEKE, H. W. G. M. ; KETTENMANN, H. : Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia. In: *J Immunol* 168 (2002), Apr, Nr. 7, S. 3221–3226
- [148] RAY, N. B. ; POWER, C. ; LYNCH, W. P. ; EWALT, L. C. ; LODMELL, D. L.: Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. In: *Arch Virol* 142 (1997), Nr. 5, S. 1011–1019
- [149] REDWINE, J. M. ; ARMSTRONG, R. C.: In vivo proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFalphaR during early remyelination. In: *J Neurobiol* 37 (1998), Nov, Nr. 3, S. 413–428
- [150] RENNICK, D. M. ; FORT, M. M.: Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278 (2000), Jun, Nr. 6, S. G829–G833
- [151] REUSS, B. ; UNSICKER, K. : Regulation of gap junction communication by

growth factors from non-neural cells to astroglia: a brief review. In: *Glia* 24 (1998), Sep, Nr. 1, S. 32–38

- [152] ROBERT KOCH-INSTITUT BERLIN: *RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte. Merkblatt Tollwut.* http://www.rki.de/cln_091/nn_504562/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Tollwut.html. http://www.rki.de/cln_091/nn_504562/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Tollwut.html. Version: Feb 2009
- [153] RUPPRECHT, C. E. ; BLASS, L. ; SMITH, K. ; ORCIARI, L. A. ; NIEZGODA, M. ; WHITFIELD, S. G. ; GIBBONS, R. V. ; GUERRA, M. ; HANLON, C. A.: Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. In: *N Engl J Med* 345 (2001), Aug, Nr. 8, S. 582–586
- [154] SANDBERG, K. ; ELORANTA, M. L. ; CAMPBELL, I. L.: Expression of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and their relationship to IFN-alpha/beta-induced genes in lymphocytic choriomeningitis. In: *J Virol* 68 (1994), Nov, Nr. 11, S. 7358–7366
- [155] SARMENTO, L. ; LI, X. qing ; HOWERTH, E. ; JACKSON, A. C. ; FU, Z. F.: Glycoprotein-mediated induction of apoptosis limits the spread of attenuated rabies viruses in the central nervous system of mice. In: *J Neurovirol* 11 (2005), Dec, Nr. 6, 571–581. <http://dx.doi.org/10.1080/13550280500385310>. – DOI 10.1080/13550280500385310
- [156] SAVINO, W. ; ARZT, E. ; DARDENNE, M. : Immunoneuroendocrine connectivity: the paradigm of the thymus-hypothalamus/pituitary axis. In: *Neuroimmunomodulation* 6 (1999), Nr. 1-2, S. 126–136
- [157] SCHNELL, M. J. ; MEBATSION, T. ; CONZELMANN, K. K.: Infectious rabies viruses from cloned cDNA. In: *EMBO J* 13 (1994), Sep, Nr. 18, S. 4195–4203

- [158] SCHNELL, M. J. ; MCGETTIGAN, J. P. ; WIRBLICH, C. ; PAPANERI, A. : The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. In: *Nat Rev Microbiol* 8 (2010), Jan, Nr. 1, 51–61. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2260>. – DOI 10.1038/nrmicro2260
- [159] SCHRÖDER, M. ; MEISEL, C. ; BUHL, K. ; PROFANTER, N. ; SIEVERT, N. ; VOLK, H.-D. ; GRÜTZ, G. : Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. In: *J Immunol* 170 (2003), May, Nr. 10, S. 5260–5267
- [160] SCHUMACHER, C. L. ; DIETZSCHOLD, B. ; ERTL, H. C. ; NIU, H. S. ; RUPPRECHT, C. E. ; KOPROWSKI, H. : Use of mouse anti-rabies monoclonal antibodies in postexposure treatment of rabies. In: *J Clin Invest* 84 (1989), Sep, Nr. 3, S. 971–975
- [161] SCHUMACHER, C. L. ; ERTL, H. C. ; KOPROWSKI, H. ; DIETZSCHOLD, B. : Inhibition of immune responses against rabies virus by monoclonal antibodies directed against rabies virus antigens. In: *Vaccine* 10 (1992), Nr. 11, S. 754–760
- [162] SEGHAIER, C. ; CLIQUET, F. ; HAMMAMI, S. ; AOUINA, T. ; TLATLI, A. ; AUBERT, M. : Rabies mass vaccination campaigns in Tunisia: are vaccinated dogs correctly immunized? In: *Am J Trop Med Hyg* 61 (1999), Dec, Nr. 6, S. 879–884
- [163] SEIF, I. ; COULON, P. ; ROLLIN, P. E. ; FLAMAND, A. : Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. In: *J Virol* 53 (1985), Mar, Nr. 3, S. 926–934
- [164] SILVERMAN, M. N. ; PEARCE, B. D. ; BIRON, C. A. ; MILLER, A. H. : Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during

- viral infection. In: *Viral Immunol* 18 (2005), Nr. 1, 41–78. <http://dx.doi.org/10.1089/vim.2005.18.41>. – DOI 10.1089/vim.2005.18.41
- [165] SMITH, J. S. ; YAGER, P. A. ; BAER, G. M.: A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. In: *Bull World Health Organ* 48 (1973), May, Nr. 5, S. 535–541
- [166] STREIT, W. J.: Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. In: *Glia* 40 (2002), Nov, Nr. 2, 133–139. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.10154>. – DOI 10.1002/glia.10154
- [167] TAO, X. Y. ; TANG, Q. ; LI, H. ; MO, Z. J. ; ZHANG, H. ; WANG, D. M. ; ZHANG, Q. ; SONG, M. ; VELASCO-VILLA, A. ; WU, X. ; RUPPRECHT, C. E. ; LIANG, G.-D. : Molecular epidemiology of rabies in Southern People's Republic of China. In: *Emerg Infect Dis* 15 (2009), Aug, Nr. 8, S. 1192–1198
- [168] TAYLOR, L. : Losing Zach. In: *Rabid Bytes; The Newsletter of The Alliance for Rabies Control* (2009), Feb, Nr. 11, S. 2
- [169] TEIGE, I. ; LIU, Y. ; ISSAZADEH-NAVIKAS, S. : IFN-beta inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs. In: *J Immunol* 177 (2006), Sep, Nr. 6, S. 3542–3553
- [170] TING, J. P. ; BALDWIN, A. S.: Regulation of MHC gene expression. In: *Curr Opin Immunol* 5 (1993), Feb, Nr. 1, S. 8–16
- [171] TORDO, N. ; POCH, O. ; ERMINE, A. ; KEITH, G. ; ROUGEON, F. : Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986), Jun, Nr. 11, S. 3914–3918
- [172] TORRES-ANJEL, M. J. ; VOLZ, D. ; TORRES, M. J. ; TURK, M. ; TSHIKUKA, J. G.: Failure to thrive, wasting syndrome, and immunodeficiency in rabies: a hypophyseal/hypothalamic/thymic axis effect of rabies virus. In: *Rev Infect Dis* 10 Suppl 4 (1988), S. S710–S725

- [173] TRAYNELIS, S. F. ; DINGLELINE, R. : Role of extracellular space in hyperosmotic suppression of potassium-induced electrographic seizures. In: *J Neurophysiol* 61 (1989), May, Nr. 5, S. 927–938
- [174] TSACOPOULOS, M. ; MAGISTRETTI, P. J.: Metabolic coupling between glia and neurons. In: *J Neurosci* 16 (1996), Feb, Nr. 3, S. 877–885
- [175] WAAL MALEFYT, R. de ; YSSEL, H. ; RONCAROLO, M. G. ; SPITS, H. ; VRIES, J. E.: Interleukin-10. In: *Curr Opin Immunol* 4 (1992), Jun, Nr. 3, S. 314–320
- [176] WAGONER, N. J. V. ; OH, J. W. ; REPOVIC, P. ; BENVENISTE, E. N.: Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. In: *J Neurosci* 19 (1999), Jul, Nr. 13, S. 5236–5244
- [177] WANG, J. ; ASENSIO, V. C. ; CAMPBELL, I. L.: Cytokines and chemokines as mediators of protection and injury in the central nervous system assessed in transgenic mice. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 265 (2002), S. 23–48
- [178] WANG, Z. W. ; SARMENTO, L. ; WANG, Y. ; LI, X. qing ; DHINGRA, V. ; TSEGAI, T. ; JIANG, B. ; FU, Z. F.: Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. In: *J Virol* 79 (2005), Oct, Nr. 19, 12554–12565. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.19.12554-12565.2005>. – DOI 10.1128/JVI.79.19.12554–12565.2005
- [179] WARRELL, D. A.: The clinical picture of rabies in man. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70 (1976), Nr. 3, S. 188–195
- [180] WARRELL, M. J.: Human deaths from cryptic bat rabies in the USA. In: *Lancet* 346 (1995), Jul, Nr. 8967, S. 65–66
- [181] WERTHEIM, H. F. L. ; NGUYEN, T. Q. ; NGUYEN, K. A. T. ; JONG, M. D. ; TAYLOR, W. R. J. ; LE, T. V. ; NGUYEN, H. H. ; NGUYEN, H. T. H. ;

- FARRAR, J. ; HORBY, P. ; NGUYEN, H. D.: Furious rabies after an atypical exposure. In: *PLoS Med* 6 (2009), Mar, Nr. 3, e44. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1000044>. – DOI 10.1371/journal.pmed.1000044
- [182] WILLIAMS, K. ; ULVESTAD, E. ; CRAGG, L. ; BLAIN, M. ; ANTEL, J. P.: Induction of primary T cell responses by human glial cells. In: *J Neurosci Res* 36 (1993), Nov, Nr. 4, 382–390. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.490360404>. – DOI 10.1002/jnr.490360404
- [183] WILLOUGHBY, J. Rodney E. Rodney E. ; TIEVES, K. S. ; HOFFMAN, G. M. ; GHANAYEM, N. S. ; AMLIE-LEFOND, C. M. ; SCHWABE, M. J. ; CHUSID, M. J. ; RUPPRECHT, C. E.: Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. In: *N Engl J Med* 352 (2005), Nr. 24, 2508–2514. <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/352/24/2508>
- [184] WILLOUGHBY, R. E. ; ROY-BURMAN, A. ; MARTIN, K. W. ; CHRISTENSEN, J. C. ; WESTENKIRSCHNER, D. F. ; FLECK, J. D. ; GLASER, C. ; HYLAND, K. ; RUPPRECHT, C. E.: Generalised cranial artery spasm in human rabies. In: *Dev Biol (Basel)* 131 (2008), S. 367–375
- [185] WILLOUGHBY, R. E.: Early death and the contraindication of vaccine during treatment of rabies. In: *Vaccine* 27 (2009), Nov, Nr. 51, 7173–7177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.032>. – DOI 10.1016/j.vaccine.2009.09.032
- [186] WOODROOFE, M. N. ; SARNA, G. S. ; WADHWA, M. ; HAYES, G. M. ; LOUGHLIN, A. J. ; TINKER, A. ; CUZNER, M. L.: Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. In: *J Neuroimmunol* 33 (1991), Sep, Nr. 3, S. 227–236
- [187] WORLD HEALTH ORGANIZATION ; F.-X., M. (Hrsg.) ; M.M., K. (Hrsg.) ; KOPROWSKI H., e. (Hrsg.): *Laboratory techniques in rabies*. Fourth Edition. WHO, Genf, Schweiz., 1996

- [188] WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO Expert Consultation on rabies: first report. In: *World Health Organ Tech Rep Ser* 931 (2005), S. 1–88, back cover
- [189] WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Zoonotic Infections*. <http://www.who.int/immunization/topics/rabies/en/index.html>.
<http://www.who.int/immunization/topics/rabies/en/index.html>.
 Version: 2007, Abruf: 4.5.2007
- [190] YAN, X. ; PROSNIAK, M. ; CURTIS, M. T. ; WEISS, M. L. ; FABER, M. ; DIETZSCHOLD, B. ; FU, Z. F.: Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain of experimentally infected mice. In: *J Neurovirol* 7 (2001), Dec, Nr. 6, S. 518–527
- [191] ZYLKA-MENHORN, V. : Infektionen durch Organspende: Ein geringes Restrisiko bleibt bestehen. In: *Deutsches Ärzteblatt* 102, Ausgabe 8 vom 25.02.2005 (2005), A-482 / B-409 / C-379. <http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?id=45580>

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tilman Krieger
Geboren am	16. Juli 1983
Geburtsort	Kassel
Kontakt:	TilmanKrieger@gmx.de

Ausbildung

Juni 2003	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife an der Jacob-Grimm-Schule Kassel (Abiturnote: 1,9)
Sept. 2003 bis Nov. 2009	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
Sept. 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (befriedigend: 3,5)
Nov. 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (befriedigend: 3,16)
Seit Okt. 2006	Doktorand in der Abteilung für Neuroimmunologie an der Philipps-Universität Marburg. Leiter der Arbeitsgruppe: Prof. Dr. E. Weihe; Betreuer: PD Dr. M. Bette. Thema: Mikroglia-Aktivierung durch unterschiedlich pathogene Rabies-Viren im Tiermodell. Angestrebter Abschluss: Dr. med.
Feb. und März 2008	Forschungsaufenthalt im Rahmen dieser Doktorarbeit am Department of Microbiology and Immunology an der Thomas-Jefferson-University Philadelphia, USA, unter der Leitung von Herrn Bernhard Dietzschold, DVM.

Praktische Tätigkeiten

März bis April sowie Aug. bis Sept. 2004	Praktikum im Bereich der Krankenpflege am Klinikum Kassel. Dabei Erlangung Pflegerischer Grundkenntnisse.
--	---

Feb. 2005	Freiwilliges zweiwöchiges Praktikum im Bereich der Pathologie am Klinikum Kassel. Assistenz bei Sektionen, Gewinnung von Kenntnissen über Gewebeaufarbeitung für die weitere Diagnostik.
Okt. 2005 bis April 2006 und Okt. 2006 bis April 2007	Studentische Hilfskraft im Kurs der Makroskopischen Anatomie an der Philipps-Universität Marburg. Assistenz bei der Präparation, Unterstützung der Lehre.
Feb. bis März 2006	Famulatur im Bereich Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Klinikum Kassel.
Sept. bis Okt. 2006	Famulatur im Bereich der Orthopädie am Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin; Schwerpunkt: Endoprothetik.
März bis April 2007	Famulatur im Bereich der Neurologie am Klinikum Kassel.
Sept. bis Okt. 2007	Famulatur in der Ambulanz der Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Freiburg. Erlangung von Kenntnissen über Wundversorgung, Mithilfe bei der Erstversorgung von Traumapatienten.
Aug. 2008 bis Juli 2009	Praktisches Jahr in den Bereichen HNO, Innere Medizin sowie Chirurgie am Universitätsklinikum Marburg.
Seit März 2010	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH / Standort Marburg

Sonstige Kenntnisse und Fähigkeiten

Sprachen	Englisch (verhandlungssicher); Latein (Latinum)
EDV-Kenntnisse	MS Office, Orbis, Linux, Bildbearbeitung (Gimp)
Fotografie	Menschen, Landschaft, Schwarzweiß; analog sowie digital.

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg:

Adamkiewicz, Dr.
Aumüller, Prof. Dr.
Basler, Prof. Dr. phil. Dr. med. habil.
Baum, Prof. Dr. med.
Berger, Prof. Dr. med.
Boudriot, Dr.
Daut, Prof.
Feuser, Dr.
Gerdes, PD Dr.
Grundmann, Dr.
Grzeschik, Prof. Dr.
Hannmann, Dr.
Herrmann-Lingen, prof. Dr. med.
Hertl, Prof. Dr.
Hilt, Prof. Dr.
Höffken, PD Dr. med.
Jungclas, Prof. Dr.
Koolman, Prof. Dr.
Krieg, Prof. Dr.
Kroll, Prof. Dr. med.
Lang, Prof. Dr.
Lill, Prof. Dr.
Lohoff, Prof. Dr.
maier, Prof. Dr.
Mandrek, Dr. Dr.
Martin, PD Dr. med.
Moll, Prof. Dr.
Mueller, Prof.
Müller-Brüsselbach, PD Dr.
Mutters, Prof. Dr.
Neubauer, Prof. Dr. med.
Oertel, Prof. Dr. med.

Opitz, Dr.
Plant, Prof. Dr.
Renz, Prof. Dr. med.
Richter, Prof. Dr.
Röper, Prof.
Schäfer, Dr. med.
Schäfer, Prof. Dr.
Schlosser, Dr. med.
Schmidt, Dr.
Schrader, Dr.
Steiniger, Prof. Dr.
Szubayko, Prof. Dr.
Vogelmeier, Prof. Dr.
Wagner, Prof. Dr.
Weihe, Prof. Dr. med.
Werner, Prof. Dr.
Westermann, Dr.
Wulf, Prof. Dr. med.

in Giessen:

Riße, Prof. Dr.

in Kassel:

Ferbert, Prof. Dr. med.
Tryba, Prof. Dr. med.

in Freiburg:

Prof. Dr. Südkamp

in Berlin

Kienapfel, prof. Dr. med.

in Philadelphia / USA:

Dietzschold, DVM

9.3 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären.

Des weiteren möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Michael Bette bedanken, denn er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen dieser Arbeit. Ohne sein Wissen, ohne seine Ideen und seine Kritik wäre unser Forschungsprojekt niemals so weit gekommen.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Eberhard Weihe gilt mein Dank. Durch eine Fülle von Ideen und neuen Sichtweisen auf die bisher erhobenen Daten sorgte er für den nötigen Antrieb und stand mir mit fundiertem Wissen stets hilfsbereit zur Seite.

Ebenso bedanke ich mich bei Mirjam A. R. Bertoune, geb. Preuß, für die intellektuelle Unterstützung, die Hilfe bei der Interpretation unserer Ergebnisse sowie die geduldige Durchsicht dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe Weihe, vor allem Michael Schneider, Romy Weber, Petra Lattermann, Heidi Hlawaty, Anette Seip, Cornelia Ringer, Cathi sowie Barbara Wiegand für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Die Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe Weihe mit der Arbeitsgruppe um Herrn Bernhard Dietzschold, DVM, war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Er selbst gab mir mit seinem fundierten Fachwissen viele Anregungen. Frau Jianwei Li und Herrn Milosz Faber standen mir bei der Laborarbeit tatkräftig zur Seite, auch ihnen sei herzlich gedankt. Gedankt sei auch der Medizinstiftung Marburg, deren Unterstützung meine Reise nach Philadelphia und die Arbeit in der Arbeitsgruppe Dietzschold erst ermöglichte.

Ich danke auch Anke Randolph und Prof. del Rey für ihre Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich während meiner Studienzeit nicht nur begleitet und tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten; außerdem all jenen, sofern sie noch nicht erwähnt wurden, die mir auch in schwierigen Lebenssituationen zur Seite standen.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die am Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Rabies-Virus-Infektion der Maus: Einfluss des viralen Glykoproteins auf die Immunantwort im ZNS.“

im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg (Geschäftsführender Direktor und Abteilungsleiter: Prof. Dr. E. Weihe; Betreuer: PD Dr. M. Bette) sowie am Department of Microbiology and Immunology an der Thomas-Jefferson-University Philadelphia, Pennsylvania, USA (Direktor: T. L. Manser, PhD; Betreuer: B. Dietzschold, DVM) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 14. Dezember 2010

Tilman Krieger